

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PAPEL DE Sirt1 EN METABOLISMO,
CÁNCER Y ENVEJECIMIENTO

TESIS DOCTORAL

DANIEL HERRANZ BENITO

Madrid, 2010

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

PAPEL DE Sirt1 EN METABOLISMO, CÁNCER Y ENVEJECIMIENTO

Daniel Herranz Benito
Licenciado en Farmacia

Este trabajo se realizó en el Centro Nacional de
Investigaciones Oncológicas (CNIO) bajo la dirección del
Dr. Manuel Serrano Marugán.

Yo, D. Manuel Serrano Marugán, certifico que la Tesis Doctoral titulada :
"PAPEL DE Sirt1 EN METABOLISMO, CÁNCER Y ENVEJECIMIENTO" ha
sido realizada en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)
por D. Daniel Herranz Benito bajo mi dirección.

Fdo: Manuel Serrano Marugán

VºBº de la tutora de tesis
Carmela Calés Bourdet

Tonight we fly
Over the houses
The streets and the trees
Over the dogs down below
They'll bark at our shadows
As we float by on the breeze

Tonight we fly
Over the chimney tops
Skylights and slates
Looking into all your lives
And wondering why
Happiness is so hard to find

Over the doctor, over the soldier
Over the farmer, over the poacher
Over the preacher, over the gambler
Over the teacher, over the rambler
Over the lawyer, over the dancer
Over the voyeur, over the builder and the destroyer
Over the hills and far away

Tonight we fly
Over the mountains
The beach and the sea
Over the friends that we've known
And those that we now know
And those who we've yet to meet

And when we die
Oh, will we be
That disappointed
Or sad
If heaven doesn't exist
What will we have missed
This life is the best we've ever had

Neil Hannon, The Divine Comedy

Agradecimientos

Se hace tremendamente raro llegar por fin al final del camino, han sido casi 5 años de lucha día a día para conseguir llegar a este momento y leer la Tesis, esa especie de quimera intangible pero que finalmente (y felizmente) termina por llegar, 5 años llenos de momentos buenos y de momentos malos, de momentos realmente duros, como muchos de vosotros ya sabéis, pero de momentos tremendamente reconfortantes también...en cualquier caso, 5 años que no cambiaría por nada. Pero, evidentemente, la culminación de este largo proceso no habría sido posible sin la ayuda, en mayor o menor medida, de mucha gente, a la que quiero en estas páginas agradecer de corazón todo su apoyo:

En primer lugar, a Manolo, por la confianza casi incondicional que me has otorgado desde el mismo comienzo, cuando ni siquiera tenía claro si quería quedarme a hacer la tesis y, a pesar de mis dudas iniciales, por haberme dejado empezar este apasionante proyecto y por tener tanta fe en mí. Sin tu apoyo hubiera sido tremendamente difícil conseguir llegar a buen puerto. Y gracias también por esas discusiones científicas e intercambios de ideas que hacen que siga manteniendo, a pesar de los pesares, la ilusión en el mundo de la ciencia.

Por supuesto, un millón gracias a mis padres...¡qué puedo decir de vuestra ayuda! Me habéis apoyado en todas y cada una de las decisiones que he ido tomando, y me habéis dado todo cuanto he podido necesitar e incluso muchísimo más. Sé que muchas veces mi carácter me hace ser algo hermético, pero no es más que la fachada, os quiero muchísimo, os adoro, y sin vosotros no habría sido posible llegar hasta aquí.

A mi hermano, por ser tan enfermo de la música y por haberme transmitido esa enfermedad. Como decía Ortega, *“yo soy yo y mi circunstancia”* y, en mi caso, la música que con la que me he impregnado desde pequeño gracias a ti ha influido profundamente en la persona que soy ahora mismo, de forma que no podría entenderme ni entender la vida misma sin ella. Gracias por todos esos conciertos y festivales en los que hemos compartido momentos inolvidables, y gracias por todos los que están aún por venir.

A todo el resto de mi familia, a mis tíos y tías, a mis primas y, especialmente, a mi abuela, porque sé que si el oscuro velo de la demencia senil te lo permitiera, disfrutarías de esta Tesis como la que más.

Y gracias por supuesto también a May, porque tú no entiendes de enfados ni de malos días, y siempre me recibes con la misma ilusión desenfundada, como si hubiera hecho una heroicidad simplemente por aparecer. Gracias a ti siempre puedo esbozar una sonrisa aún en un mal día.

Como decía el gran Alejo, yo no venía a trabajar para hacer amigos, sin embargo, he tenido la suerte descomunal de encontrarme con Antonio, Pablo y Maribel en este camino:

Gracias a Antonio, *mi jodido noir favorito*, por TODO. Por estar siempre disponible para escuchar mis problemas científicos y también personales, y ofrecermme siempre brillantes ideas y estupendos consejos para abordarlos, eres el faro que ha impedido que este barco se hunda más de una vez. Gracias por todos los viajes y momentos realmente especiales e inolvidables que hemos compartido perdidos en cualquier bar, en cualquier festival, en cualquier país...y gracias porque tu entusiasmo por la ciencia y la forma en la que consigues transmitirlo son los culpables de que haya optado por seguir en este mundillo. Gracias, porque contigo cerca, no sólo la ciencia sino también la vida misma, es mucho más alegre y divertida. Gracias por la fe que tienes en mí, mayor que la que yo mismo tengo en muchos momentos, espero cumplir tus expectativas (te suena, ¿verdad?). En definitiva, gracias por haber estado ahí en todos y cada uno de los momentos difíciles de este camino, por todas las risas y lágrimas compartidas y por esa conexión absolutamente única que muchos buscan, pero que sólo unos pocos afortunados encontramos, eres *mi jodido sibling*. Gracias, gracias, gracias, gracias...

Gracias a Pablo, por su infinita paciencia conmigo, por esas carreritas en las que siempre tenías tiempo para escucharme y ofrecermme tus consejos. Gracias por ese enriquecedor intercambio musical (¡jamás me habría imaginado viendo óperas!) y por hacer que, simplemente con tu presencia, la vida en el laboratorio fuera más llevadera...todo ha sido mucho más difícil aquí desde que te fuiste, pero como dicen en Cadena Perpetua: *“Algunos pájaros no pueden ser enjaulados, sus plumas son demasiado hermosas. Y cuando se van volando se alegra esa parte de ti que siempre supo que era un pecado enjaularlos. Aun así, el lugar donde tú sigues viviendo resulta más gris y vacío cuando ya no están.”*

Gracias a Maribel, por tu ayuda infinita con los animales, sin tu trabajo esta Tesis y los trabajos publicados durante este proceso habrían sido totalmente

imposibles. Gracias por todos esos cafés y comidas, y por todas las charlas y conversaciones en las que has aguantado que sea un *gruñón*, pero gracias también y principalmente por ofrecerme tu amistad, que es algo que valoro y aprecio profundamente y que espero no perder jamás, *jefa*.

Gracias a Penélope, mi hermana, mi alma gemela, por ser la persona más absolutamente fascinante de este planeta. Por haberme ofrecido desde el comienzo toda tu ayuda, que ha sido incalculable, sin pedir nada a cambio. Si pudiera devolverte, aunque fuera en una milésima parte, todo lo que tú me has dado, ya sería el hombre más feliz del mundo. Gracias porque sé que sientes esta Tesis como si fuera tuya y estás más orgullosa de ella casi que yo mismo, y porque has vivido conmigo todas las tristezas y alegrías de los últimos tiempos, y espero que siga siendo siempre así. Sabes que te voy a echar infinitamente de menos cuando me vaya, pero como ya te he dicho en alguna ocasión: “...*we see things they'll never see, you and I are gonna live forever...*”

Gracias por supuesto a toda la gente de la sierra, a Manuel, Francisco, Andrés, Javi, Marta, María, Juan Carlos, Claudia, Anita, Felipe, Álex...porque con vosotros cerca, los problemas son siempre menos problemas. Gracias por todas las cervezas, cines, salidas, cenas, festivales y, simplemente, por estar ahí. Sois geniales.

Gracias a toda la gente del Home, porque de verdad es como estar en casa, y gracias especialmente a Willy (¡ya eres más del Home que yo mismo!), por todas las fechorías musicales y no musicales que hemos compartido...gracias *señor Lobo*.

Y gracias también a una cantidad casi inabarcable de gente del CNIO, que me han ayudado en todo este trayecto:

Gracias a Paco, Sergio y Marta, así en conjunto, porque estos últimos meses han sido geniales gracias a vosotros...¡cuántas cañas hemos desperdiciado antes de conoceros, habrá que recuperar el tiempo perdido!

Gracias a Marta Cañamero (y a todas tus chicas), por ser un auténtico cielo, por ese buen humor que transmites, y por todo lo que he aprendido de ti, que seguro que será solo una décima parte de todo lo que me has enseñado...eres impresionante.

Gracias a Paqui y a Gema, por vuestra crucial ayuda con los animales.

Agradecimientos

Gracias a Toñi porque, a pesar de habernos *reencontrado* tarde ya, ha sido un reencuentro maravilloso. Y las gracias por *aquellos bonitos días* te las tengo que dar yo a ti, y no al revés.

Gracias a Arancha, por ser siempre tú misma, una *fashion victim* (con cariño) realmente única.

Gracias a Ana, por ser una excepcional compañera de trabajo, y por todas las risas que me he echado contigo en estos años.

Gracias a María porque, a pesar de llevar poco tiempo en el laboratorio, la luz que has traído en estos meses ha sido casi cegadora. No podría haber habido nadie mejor para intentar llenar el hueco dejado por Pablo. Gracias por todas esas cañas y copas y conversaciones *hablando en plata*, y gracias por ser como eres, por esa jovialidad irresistiblemente contagiosa.

Gracias a Manuel, por todas las charlas científicas y musicales, siempre enriquecedoras, que hemos tenido.

Gracias a Han, por estar tan genuinamente loca.

Gracias a Martina, por esas *delicatessen* culinarias con las que nos obsequias.

Gracias también a Isabel (¡ese clan boticario!) y a Alejo (eres grande, no me cansaré de decirlo)... ¡se os echa en falta por aquí!

Gracias a Susana, por tu ayuda inicial y porque contigo aprendí lo duro que puede ser este mundo.

Gracias, en general, a todos los miembros presentes y pasados tanto de Supresión como de Telómeros, porque todos habéis contribuido a que esta Tesis haya salido adelante.

Gracias también tanto al Instituto de Salud Carlos III como a la Fundación Francisco Cobos, por el apoyo económico durante estos años.

Gracias a Jorge, Víctor, Javi, Álvaro, Yure, Carol...y gracias, por último, a toda la gente de la que me esté olvidando, sin pretenderlo, en estos momentos, que seguro que sois bastantes..

¡Gracias por estos 5 años!

Resumen/Summary

Sirt1 es una proteína que se ha implicado extensamente en el aumento de la longevidad en organismos modelo. Además, diversos trabajos indicaban que podría tener también funciones importantes en el control del metabolismo así como en el desarrollo de cáncer. Nosotros hemos generado líneas de ratones que sobreexpresan Sirt1 (≈ 3 veces) bajo el control de sus propios elementos reguladores para profundizar en el conocimiento de las funciones *in vivo* de Sirt1 en mamíferos.

Los ratones Sirt1-tg están protegidos frente al daño metabólico asociado al consumo de una dieta rica en grasas (HFD). Así, presentan una menor esteatosis y una mayor tolerancia a la glucosa que animales wt control tratados con HFD. A nivel mecanístico, esta protección se debe al menos a dos mecanismos distintos: por un lado, a la menor expresión de citoquinas inflamatorias a través de la inhibición de NF κ B; por otra parte, a la mayor expresión de proteínas antioxidantes, posiblemente a través de la activación de PGC1 α .

En cuanto a su efecto en la longevidad, demostramos que los ratones Sirt1-tg muestran curvas de supervivencia indistinguibles de las de sus controles wt. Sin embargo, y aún presentando una longevidad similar, muestran una mejor salud a lo largo del proceso de envejecimiento. Así, los ratones Sirt1-tg muestran menor incidencia de cáncer espontáneo asociado al envejecimiento y están parcialmente protegidos del desarrollo de patologías asociadas al envejecimiento como son la *diabetes mellitus* tipo II y la osteoporosis. A nivel molecular, presentan también menores niveles de p16^{Ink4a} y de células con daño en el ADN, que son marcadores comúnmente asociados al envejecimiento. Más aún, los ratones Sirt1-tg están protegidos frente al desarrollo de cáncer hepático inducido por dietilnitrosamina (DEN) y asociado a síndrome metabólico. Demostramos que dicha resistencia se debe tanto a la protección hepática frente a la HFD como a una protección hepática frente al daño inicial en el ADN causado por el DEN.

Por otra parte, hemos determinado el efecto de Sirt1 en el desarrollo de cáncer en *backgrounds* genéticos predispuestos al mismo. Así, la sobreexpresión de Sirt1 en un fondo p53-KO no afecta a la aparición de tumores mientras que su sobreexpresión en un fondo PTEN-het acelera la muerte de los ratones debido a un desarrollo más temprano de cáncer de tiroides. Este efecto se ve acompañado por unos mayores niveles de p(S473)AKT en los tiroides de estos animales y, además, demostramos que Sirt1 se encuentra sobreexpresado en muestras de cáncer de tiroides humano con respecto a muestras de tiroides normal. Por último, exploramos el efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre el desarrollo de adenocarcinomas de pulmón inducidos por el oncogén KRas^{V12} y demostramos que la sobreexpresión de Sirt1 confiere una elevada protección frente al desarrollo de este tipo de tumores.

Sirt1 is a protein that has been extensively implicated in mediating lifespan extension in model organisms. Moreover, different studies suggested that it might also have critical roles in the control of metabolism, as well as, in the development of cancer. We have generated transgenic mouse lines that overexpress Sirt1 (≈ 3 -fold) under the control of its own regulatory elements with the aim of deepening our understanding of Sirt1 functions *in vivo* in mammals.

Sirt1-tg mice are protected from metabolic damage associated to high-fat diet (HFD). Thus, they show lower levels of hepatic steatosis and they show an improved glucose tolerance compared to wt mice treated with HFD. At the mechanistic level, this protection is due to, at least, two different mechanisms: the lower expression of inflammatory cytokines through the inhibition of NF κ B and the induction of antioxidant proteins, possibly via PGC1 α activation.

Regarding its effect on longevity, we show that Sirt1-tg mice display survival curves that are indistinguishable from those of their wt controls. However, and despite the lack of effect on longevity, they show a better health during ageing. Sirt1-tg mice develop fewer spontaneous tumors and they are partially protected from the development of ageing-associated diseases like type II diabetes or osteoporosis. At the molecular level, Sirt1-tg mice show decreased expression of p16^{Ink4a} and lower accumulation of DNA damaged cells, both of which are established markers of the ageing process. Moreover, Sirt1-tg mice are protected from the development of hepatic carcinomas induced by diethylnitrosamine (DEN) and associated to metabolic syndrome. We demonstrate that this resistance is due to the hepatic protection from both HFD-induced damage and from the initial DNA damage caused by DEN.

In addition, we have determined the effect of Sirt1 on cancer development in genetic backgrounds that are cancer-prone. Thus, Sirt1 overexpression in a p53-KO background does not affect tumorigenesis while its overexpression in a PTEN-het background decreases the survival of these mice due to an accelerated thyroid cancer development. This effect is accompanied by higher levels of p(S473)AKT in the thyroid and, moreover, we show that Sirt1 is upregulated in human thyroid cancer compared to its expression in normal thyroid. Finally, we explore the effect of Sirt1 overexpression on the development of lung adenocarcinomas driven by the oncogene KRas^{V12} and we demonstrate that Sirt1 overexpression protects dramatically from the development of this type of tumors.

Índice

Introducción	1
I. Descubrimiento de Sir2	3
II. Sir2 y longevidad	4
II.1. Restricción calórica	4
II.2. Sir2 y restricción calórica	5
II.3. Activadores de Sir2	7
III. Sir2 en mamíferos : Sirt1	8
III.1. Las sirtuínas	8
III.2. Sirt1: datos <i>in vitro</i>	10
III.2.1. Sirt1 y p53	10
III.2.2. Sirt1 y NFκB	11
III.2.3. Sirt1 y otros factores de transcripción	11
III.2.4. Sirt1 y respuesta a la disponibilidad de nutrientes	12
III.3. Sirt1: datos <i>in vivo</i>	12
III.3.1. Ratones Sirt1 <i>knock-out</i>	12
III.3.2. Ratones que sobreexpresan Sirt1 en páncreas	13
III.3.3. Sirt1, restricción calórica y ayuno : PGC-1α, Ku-70 y AMPK	14
III.3.4. Sirt1 y síndrome metabólico	14
IV. Sirt1 y cáncer	15
Objetivos	19
Materiales y métodos	23
I. Cultivos celulares	25

I.1. Tipos celulares y condiciones de cultivo	25
I.2. Preparación de fibroblastos embrionarios de ratón	25
I.3. Infección retroviral de MEFs	26
I.4. Formación de focos en MEFs	26
I.5. Ensayos de proliferación en células tumorales	27
I.6. Ensayos del gen reportero luciferasa	27
I.7. Ensayos de reparación de daño en el ADN en MEFs	27
I.8. Ensayos de sobreexpresión en células U2OS	28
I.9. Ensayos de silenciamiento de Sirt1 en células de tiroides	28
II. Ensayos con ratones	28
II.1. Generación de las líneas de ratones que sobreexpresan Sirt1	28
II.2. Mantenimiento de las colonias de ratones	29
II.3. Fenotipado metabólico de los ratones	30
II.4. Ensayos de salud en el envejecimiento	31
II.5. Obtención y procesamiento de muestras de ratón	31
II.6. Histología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	32
II.7. Ensayos de sensibilidad al LPS	33
II.8. Ensayos de respuesta a tiempo corto al DEN	33
II.9. Carcinogénesis química por DEN/HFD	33
II.10. Carcinogénesis química por 3MC	33
II.11. Activación de Cre-ER y determinación de lesiones en pulmón	34
III. Métodos Bioquímicos	34
III.1. Southern Blot	34
III.2. Northern Blot	35
III.3. Western Blot	35
III.4. qRT-PCR	36
IV. Tumores humanos	39
IV.1. Origen, obtención y procesamiento de tumores de tiroides humanos	39

I. Generación y caracterización de los ratones Sirt1-tg	43
I.1. Generación de los ratones Sirt1-tg	43
I.2. Caracterización de los niveles de expresión y funcionalidad de los transgenes de Sirt1	45
II. Análisis del efecto de Sirt1 sobre el metabolismo	48
II.1. Exploración del efecto de Sirt1 sobre el metabolismo basal y la homeostasis energética	48
II.2. Sirt1 protege del desarrollo de esteatosis hepática asociado a HFD	50
II.3. Sirt1 protege de la intolerancia hepática frente a la glucosa inducida por la HFD	52
II.4. Sirt1 protege de la inflamación hepática inducida por la HFD	54
III. Análisis del efecto de Sirt1 sobre el envejecimiento	58
III.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 en la longevidad	58
III.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre enfermedades asociadas al envejecimiento	59
III.2.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre el desarrollo espontáneo de tumores	59
III.2.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la homeostasis de la glucosa	60
III.2.3. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la densidad mineral ósea	61
III.2.4. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la cicatrización de la piel y la coordinación neuromuscular	61
III.3. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre marcadores moleculares asociados al proceso de envejecimiento	62
IV. Análisis del efecto de Sirt1 sobre el desarrollo de cáncer	63
IV.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre el desarrollo de cáncer inducido químicamente	63
IV.1.1. Sirt1 protege del desarrollo de cáncer de hígado asociado a síndrome metabólico	63
IV.1.2. Sirt1 no afecta a la generación de fibrosarcomas inducidos por 3-metilcolantreno (3MC)	68

IV.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre el desarrollo de cáncer inducido genéticamente	69
IV.2.1. Ratones Sirt1-tg/p53-KO	70
IV.2.2. Ratones Sirt1-tg/PTEN-HET	71
IV.2.3. Ratones Sirt1-tg/KRas ^{V12}	79
 Discusión	 83
 I. Sirt1 y metabolismo	 85
 II. Sirt1 y envejecimiento	 89
 II. Sirt1 y cáncer	 91
III.1. Sirt1 y cáncer espontáneo	91
III.2. Sirt1 y carcinogénesis química	93
III.3. Sirt1 y carcinogénesis genética	95
 Conclusiones	 101
 Bibliografía	 105
 Anexo	 123

Clave de abreviaturas

3MC (3-metil-colantreno)
4OHT (4-hidroxi-tamoxifeno)
ADN (Ácido desoxirribonucleico)
ALT (Alanina aminotransferasa)
ARN (Ácido ribonucleico)
AUC (Area under curve; área bajo la curva)
BACs (Bacterial Artificial Chromosomes; cromosomas bacterianos artificiales)
BAT (Brown adipose tissue; grasa parda)
BSA (Bovine serum albumine; albúmina de suero bovino)
CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas)
CR (Calorie Restriction; Restricción calórica)
DEN (Dietilnitrosamina)
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO (Dimetil-sulfóxido)
EDTA (Ácido etilen-diamino-tetra-acético)
EGF (Epidermal growth factor; factor de crecimiento epidérmico)
EOD (Every other day fasting; ayuno en días alternos)
ER (Estrogen receptor; Receptor de estrógenos)
ERCs (Extraribosomal rDNA circles; círculos de ADN ribosomal extracromosómicos)
GTT (Glucose tolerance test; test de tolerancia a la glucosa)
H/E (Hematoxilina/eosina)
HDACs (Histone deacetylases / deacetilasas de histonas)
IHQ (Immunohistoquímica)
ITT (Insulin tolerance test; test de tolerancia a la insulina)
IRES (Internal ribosomal entry site; sitio interno de entrada ribosomal)
IIB (Instituto de Investigaciones Biomédicas)
LPA (Lysophosphatidic acid; ácido lisofosfatídico)
MEFs (Mouse embryo fibroblasts; fibroblastos embrionarios de ratón)
microCT (micro-Computerized Tomography; microtomografía computerizada)
MoMLV (Moloney murine leukemia virus)
NCBI (National Center for Biotechnology Information; centro nacional de información biotecnológica)
ORF (Open reading frame; marco de lectura abierto)
PCR (Polymerase chain reaction; reacción en cadena de la polimerasa)
PTEN (Phosphatase and tensin homolog)
PTT (Pyruvate tolerance test; test de tolerancia al piruvato)
PBS (Phospate buffer saline; tampón fosfato salino)

PIN (Prostate intraepithelial neoplasia; neoplasia prostática intraepitelial)

Sir2 (Silent information regulator 2)

Sirt1 (Silent information regulation two homolog 1)

RPMI (Rosswell-Park-Memorial-Institute)

SEM (Standard error of the mean; error estándar de la media)

SFB (Suero fetal bovino)

shRNA (Short hairpin RNA)

tg (Transgén)

TNF- α (Tumor necrosis factor alpha; factor de necrosis tumoral alfa)

TP (Tríada portal)

VC (Vena central)

WAT (White adipose tissue; grasa blanca)

wt (wild-type; silvestre)

Introducción

I. Descubrimiento de SIR2

Para introducir al gen *Sirt1*, se hace totalmente necesario hablar primeramente de *Sir2*, su homólogo en levaduras. Diversos estudios en *S. cerevisiae* consiguieron identificar factores celulares que se requerían para el silenciamiento transcripcional, entre los cuales se encontraban los genes *Sir*. Así, se descubrió que *Sir2*, *Sir3* y *Sir4* (siendo *Sir* el acrónimo de Silent Information Regulator) eran necesarios para el silenciamiento en los *mating-type loci* y en los telómeros, mientras que *Sir2* se necesitaba también adicionalmente para el silenciamiento en el ADN ribosomal (Blander and Guarente, 2004). Dicho silenciamiento requería la deacetilación de ciertos residuos de lisina en las histonas H3 y H4, lo que sugería que *Sir2* podría funcionar como una deacetilasa de histonas, como se corroboró más adelante (Imai *et al.*, 2000). De hecho, la acetilación en los residuos de lisina de las histonas es una de las características de la cromatina activa, mientras que las histonas deacetiladas pueden compactarse en una forma más cerrada y característica de la cromatina silenciada.

Sir2, a diferencia de *Sir3* o *Sir4*, es un gen altamente conservado a lo largo de la evolución, de forma que se han descrito homólogos en organismos que van desde las arqueobacterias hasta los humanos, y es una deacetilasa de histonas muy particular y distinta del resto, ya que depende de NAD^+ para llevar a cabo su actividad enzimática (Imai *et al.*, 2000). Así, *Sir2* presenta dos actividades enzimáticas distintas pero acopladas: por un lado es una deacetilasa y, por otro, es una O-ADP-ribosil-transferasa ya que en la reacción el NAD^+ se hidroliza, dando lugar a nicotinamida (NAM) y a otro compuesto, la O-acetil-ADP-ribosa (**Figura 1**). El hecho de que una reacción energéticamente favorable como es la deacetilación requiriese la hidrólisis simultánea de NAD^+ fue una de las primeras indicaciones que sugerían que *Sir2* podría jugar un papel crucial también en la regulación del metabolismo energético, y que su actividad podría estar influenciada por el ratio NAD^+/NADH .



Figura 1. Esquema de la reacción enzimática catalizada por Sir2. En mamíferos, el sustrato puede ser también una proteína acetilada aunque no sea una histona. La nicotinamida (NAM), uno de los productos de la reacción, actúa como inhibidor de la actividad de *Sir2*.

II. Sir2 y longevidad

II.1. Restricción calórica

La restricción calórica (CR), es decir, un régimen alimentario caracterizado por una moderada reducción en el porcentaje calórico, pero sin llegar a la malnutrición, es la intervención más efectiva y universal para conseguir un aumento en la longevidad. Así, se ha demostrado que la CR aumenta la vida media de organismos como *S. cerevisiae*, *C. elegans* o *D. melanogaster*, y este efecto también se presenta en los mamíferos. Además, la CR reduce la incidencia de enfermedades asociadas al envejecimiento como la diabetes o el cáncer en distintos modelos animales (Bordone and Guarente, 2005).

Las primeras evidencias científicas de que una disminución en la ingesta calórica podría aumentar la longevidad datan de hace 75 años, cuando se observó que, al alimentar ratas con un 20% de celulosa (que no pueden digerir) en la comida, aumentaba de forma significativa tanto la vida media como la vida máxima de dichos roedores (McCay *et al.*, 1935). Sin embargo, a pesar de que los efectos positivos de la CR se conocen desde hace décadas, los mecanismos moleculares que median sus efectos permanecen sin elucidarse por completo.

Las primeras hipótesis que surgieron para explicar este efecto sugerían que podía deberse simplemente a un retraso en el crecimiento y desarrollo del animal debido a la menor ingesta de calorías, pero esta idea se desechó una vez que se demostró que la CR también tenía efectos positivos cuando se comenzaba el tratamiento en la edad adulta. Otra hipótesis temprana sugería que podía deberse a que la CR provocase una menor tasa metabólica en los distintos animales. Esta idea surgió a partir de estudios del fisiólogo alemán Rubner (1908) que sugerían que animales de distintos tamaños utilizaban un número similar de calorías por gramo de peso a lo largo de la vida. Posteriormente, varios investigadores publicaron que la CR disminuía la tasa metabólica por unidad de masa en las ratas, lo que llevó a especular que la CR actuase disminuyendo dicha tasa metabólica. Sin embargo, numerosos estudios posteriores arrojaron datos contrarios, en los que los animales presentaban niveles similares, o incluso superiores, en su tasa metabólica, lo que hizo que dicha hipótesis cayera en el olvido. Un tercer argumento para intentar explicar los resultados de la CR fue que se debiera a un artefacto de laboratorio. Siguiendo este razonamiento, la CR sería la dieta que un animal podría llevar en la vida al aire libre, mientras que los animales tratados *ad libitum* estarían siendo

sobrealimentados en realidad, pero el hecho de que la CR aumente la longevidad en una variedad tan grande de especies hace altamente improbable que sea un artefacto de laboratorio.

En la actualidad, hay numerosas teorías que intentan explicar los efectos de la CR y, aunque no vamos a entrar a discutir las en profundidad en la presente Introducción, parte de dichas hipótesis son: la inhibición de la ruta de los glucocorticoides, la disminución en los depósitos de grasa, la disminución en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), una mayor supervivencia celular, una mejora en el reciclado de las proteínas, la obtención de menores niveles de glucosa e insulina en sangre u otros cambios endocrinos adicionales. Sin embargo, ninguna de ellas ha demostrado ser la causa principal de los efectos de la CR, al menos en los estudios que se han realizado hasta el momento.

En los últimos años, diversos investigadores han sugerido otra explicación que intenta englobar todos los resultados obtenidos hasta la fecha, y es la de la hipótesis hormética de la CR. Según dicha hipótesis, una ingesta relativamente baja de calorías generaría un estrés moderado que provocaría una respuesta de supervivencia en el organismo para ayudarlo a hacer frente a dicha adversidad a través de la alteración del metabolismo, aumentando así las defensas del organismo contra las causas del envejecimiento. Siguiendo los postulados de dicha hipótesis, cabría la posibilidad de que existieran *genes de la longevidad*, que serían los encargados de coordinar toda esa respuesta, y es aquí donde Sir2 ha levantado grandes expectativas en los años precedentes. Todas estas posibilidades han sido y continúan siendo objeto de gran interés por parte de la comunidad científica (Sinclair, 2005).

II.2. Sir2 y restricción calórica

Poco después del descubrimiento del gen Sir2, se llevaron a cabo estudios genéticos en *S. cerevisiae* que demostraron la importancia de Sir2 en la longevidad de las levaduras. Aquí hay que resaltar que, en el caso de las levaduras, la longevidad puede medirse de dos formas diferentes, lo que puede generar resultados contrapuestos. Por un lado, se puede medir la *longevidad replicativa*, que hace referencia al número de divisiones celulares que sufre la célula madre antes de parar de dividirse por completo, por lo que podría ser un modelo útil de extrapolar a las células de mamíferos que permanecen mitóticamente activas. Por otro lado, se puede medir la *longevidad cronológica*, que se ha definido como la cantidad de

tiempo que puede sobrevivir una célula en estado no mitótico y podría ser, por lo tanto, más similar a lo que ocurre en células de mamíferos en estado post-mitótico. La forma tradicional de investigar el *envejecimiento* en levaduras ha sido la medida de la longevidad replicativa. Así, se descubrió que la deficiencia de Sir2 provocaba una reducción del 50% en la longevidad replicativa, mientras que su sobreexpresión aumentaba dicha vida media en un 30% (Kaeberlein *et al.*, 1999). El mecanismo por el cual Sir2 protege de dicho envejecimiento es protegiendo de la inestabilidad cromosómica a nivel de las repeticiones de ADN ribosomal, de forma que reprime la recombinación en dicho ADN ribosomal, que es la que genera los llamados *círculos de ADN ribosomal extracromosómicos* (ERCs). Dichos ERCs se van acumulando exponencialmente en la célula madre tras cada división y terminan por ser letales para la misma. Por el contrario, estudios posteriores que se centraron en medir la longevidad cronológica, en la que probablemente los ERCs no juegan un papel tan importante, demostraron que era la deficiencia de Sir2 la que, por el contrario, aumentaba dicha longevidad (Fabrizio *et al.*, 2005).

Dichos resultados contradictorios generaron gran discusión en cuanto a su interpretación y posible extrapolación a otros organismos, sin embargo, los efectos protectores de Sir2 frente al envejecimiento no se demostraron únicamente en la longevidad replicativa de *S. cerevisiae*, sino que otros estudios confirmaron que la sobreexpresión de Sir2 en *C. elegans* (Tissenbaum and Guarente, 2001) y en *D. melanogaster* (Rogina and Helfand, 2004) proporcionaban un aumento en la longevidad de hasta el 60% y el 30%, respectivamente. Asimismo, y de forma importante, se demostró que Sir2 era absolutamente imprescindible para que la CR confiriese un aumento en la longevidad tanto en *S. cerevisiae* (Lin *et al.*, 2000) como en *D. melanogaster* (Rogina and Helfand, 2004). A nivel mecanístico, el aumento de la longevidad en *C. elegans* se atribuyó a la inhibición de DAF-16, un factor de transcripción de la familia Forkhead que actúa en la ruta de señalización *insulin-like*; por su parte, en *D. melanogaster* el mecanismo de acción de la CR se atribuyó a la inhibición de RPD3, que es un regulador negativo de Sir2 en dicho organismo. En cuanto a la forma por la cual se estaría activando Sir2 en respuesta a la CR en *S. cerevisiae*, se postularon dos mecanismos concomitantes. Por un lado, la CR generaría un cambio hacia una mayor respiración en detrimento de la fermentación, de forma que aumentaría el ratio $NAD^+/NADH$, y esto activaría a Sir2. Por otra parte, la CR también aumenta la actividad de PNC1, que se encarga de transformar la

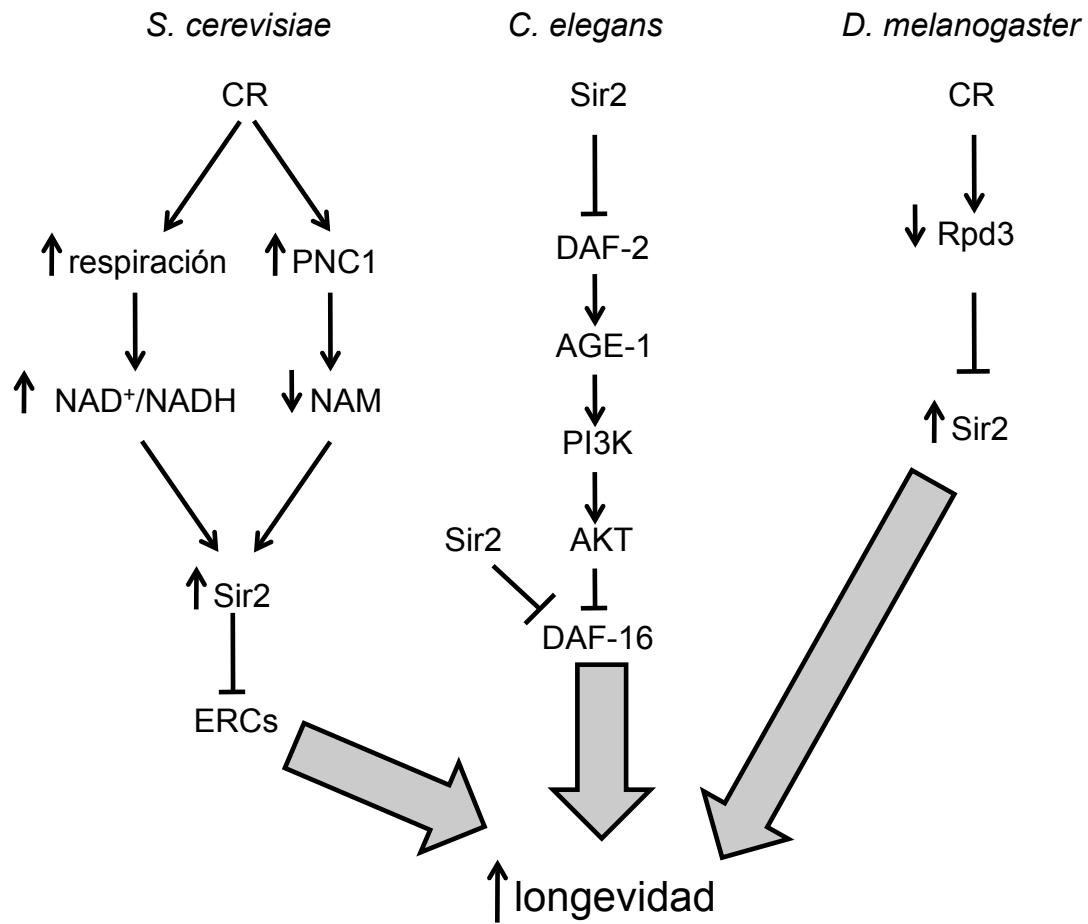


Figura 2. Esquema de los mecanismos propuestos en los distintos organismos para explicar el aumento de longevidad mediado por Sir2.

nicotinamida de nuevo en NAD⁺, y dicha disminución en los niveles de nicotinamida serviría para activar también a Sir2. Todos estos resultados, que se resumen esquemáticamente en la **Figura 2**, sugerían la posibilidad de que Sir2 fuera un *gen de longevidad*, cuyos niveles de expresión podrían influir directamente en la misma y, más aun, sugerían que Sir2 era el mediador de los efectos obtenidos con la CR.

II.3. Activadores de Sir2

De forma paralela a los estudios genéticos con Sir2, se llevaron a cabo distintos *screenings* para encontrar compuestos capaces de estimular la actividad de Sir2 y, gracias a ellos, se encontraron numerosos activadores, siendo el resveratrol el más potente de todos (Howitz *et al.*, 2003). El resveratrol es un polifenol natural (**Figura 3**) que se encuentra en numerosas especies vegetales como la uva y al que ya se le habían atribuido propiedades beneficiosas sobre la salud. Más en concreto, se especulaba con que el resveratrol fuese el responsable de la llamada *paradoja*

francesa. Dicha paradoja hace referencia a la relativa baja frecuencia de enfermedades cardiovasculares que se dan en la población francesa, a pesar de consumir una dieta elevada en grasas, y diversos investigadores propusieron que dicho efecto podía ser debido a la presencia de elevadas cantidades de resveratrol en el vino tinto, que a su vez se consume en de forma abundante en Francia (Sun *et al.*, 2002).

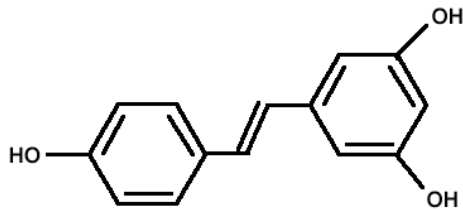


Figura 3. Estructura química del resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-estilbeno).

Más allá de que el resveratrol sea o no responsable de dicha paradoja, su descubrimiento como activador de Sir2 llevó a la comunidad científica a intentar reproducir con dicho compuesto los efectos observados con la sobreexpresión genética de Sir2 y, de forma similar a lo observado previamente, las levaduras tratadas con resveratrol mostraban un aumento en su *longevidad replicativa* de hasta el 70% (Howitz *et al.*, 2003). Asimismo, el tratamiento con resveratrol en *C. elegans* y *D. melanogaster* demostró nuevamente que era capaz de aumentar la longevidad de dichos organismos de forma dependiente de Sir2 (Wood *et al.*, 2004). Más aún, al combinar el resveratrol con la CR, no se observaron efectos aditivos en ninguno de dichos organismos, lo que sugería una vez más que el resveratrol era capaz de activar a Sir2, y que Sir2 a su vez era el responsable de mediar los efectos de la CR sobre la longevidad de los organismos. Adicionalmente, un estudio algo posterior demostró que el resveratrol era capaz de aumentar la vida media también en vertebrados, usando *Nothobranchius furzeri* (un pez de vida media muy corta) como modelo (Valenzano *et al.*, 2006). Todo esto llevó a proponer al resveratrol y al resto de activadores de Sir2 como *miméticos de la CR*, y arrojó grandes expectativas en cuanto a su posible uso en los humanos para combatir el envejecimiento y sus enfermedades asociadas

III. Sir2 en mamíferos : Sirt1

III.1. Las sirtuínas

Como ya hemos comentado, los efectos de Sir2 en organismos modelo despertaron gran interés en los posibles paralelismos con el homólogo de Sir2 en mamíferos. Sin embargo, no hay un único homólogo en los mamíferos, sino que hasta la fecha se han identificado hasta 7 homólogos diferentes de Sir2 (**Figura 4**).

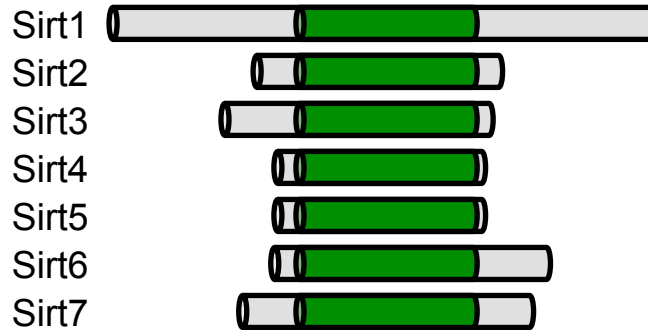


Figura 4. Esquema de la estructura de las distintas sirtuínas. El dominio conservado entre ellas con actividad deacetilasa se representa en verde, mientras que presentan variaciones tanto en el dominio C-terminal como en el dominio N-terminal.

Estos homólogos reciben el nombre de Sirt1-7 (silent information regulador two homologs 1-7) y se conocen por el nombre genérico de sirtuínas. Dichas sirtuínas se componen de un dominio central conservado, mientras que presentan variaciones en las secuencias C- y N-terminales. De todas ellas, Sirt1 es el homólogo más cercano al gen Sir2 en organismos modelo, y esto hizo que la mayoría de los esfuerzos tempranos encaminados a profundizar en el conocimiento de las

		knockout	sobreexpresión
Sirt1	nuclear citoplásmica	letalidad perinatal, defectos cardíacos, oculares y óseos (Cheng <i>et al.</i> , 2003) (McBurney <i>et al.</i> , 2003)	mayor liberación de insulina, efectos en corazón dosis-dependientes, protección frente a los efectos de la dieta rica en grasas, mejor envejecimiento y protección frente al cáncer (Moynihan <i>et al.</i> , 2005) (Alcendor <i>et al.</i> , 2007) (Pfluger*, Herranz* <i>et al.</i> , 2008) (Banks <i>et al.</i> , 2008) (Herranz <i>et al.</i> , 2010) (Oberdoerffer <i>et al.</i> , 2009)
Sirt2	nuclear citoplásmica	menores niveles de ac-H4K16 en MEFs (Vaquero <i>et al.</i> , 2006)	sin publicar
Sirt3	mitocondrial nuclear	desarrollo normal, cambios en la actividad de AceCS2, en los niveles de ATP y en la acetilación de proteínas mitocondriales (Lombard <i>et al.</i> , 2007)	protección frente a hipertrofia miocárdica (Sundaresan <i>et al.</i> , 2009)
Sirt4	mitocondrial	aparentemente normales, mayor actividad GDH en mitocondria, mayor secreción de insulina (Haigis <i>et al.</i> , 2006)	sin publicar
Sirt5	mitocondrial	defectos en el ciclo de la urea ya que Sirt5 inhibe a CPS1 (Nakagawa <i>et al.</i> , 2009)	mejor detoxificación del amoníaco (Ogura <i>et al.</i> , 2010)
Sirt6	nuclear	síndrome similar a la progeria, hipoglicemia y muerte al mes de vida (Mostoslavsky <i>et al.</i> , 2006)	protección frente a dieta grasa (Kanfi <i>et al.</i> , 2009).
Sirt7	nucleolar	cardiomiopatía y longevidad reducida (Vakhrusheva <i>et al.</i> , 2008)	sin publicar

Tabla 1. Efectos observados en los distintos modelos genéticos publicados en ratón de las diferentes sirtuínas.

funciones de las sirtuínas se centrasen en el propio Sirt1. Por su parte, el resto de las sirtuínas han permanecido menos estudiadas hasta los últimos años, en los que han ido ganando protagonismo poco a poco de forma que, en la actualidad, se han publicado diversos modelos genéticos de casi todas ellas (**Tabla 1**). No obstante, al comienzo del presente estudio sólo se conocían en ratón los efectos producidos por la deficiencia de Sirt1 (Cheng *et al.*, 2003; McBurney *et al.*, 2003). Conviene resaltar también que el dominio con actividad deacetilasa de las sirtuínas es distinto al de otras deacetilasas de histonas (HDACs), que son dependientes de Zn^{2+} , y son sensibles al tratamiento con inhibidores como el butirato sódico o la tricostatina A, mientras que las sirtuínas son insensibles a dichos inhibidores, por lo que están englobadas dentro del tipo III de las HDACs.

III.2. Sirt1: datos *in vitro*

Sirt1 es una proteína de localización principalmente nuclear y que, como Sir2, es una deacetilasa dependiente de NAD^+ . Sin embargo, y a diferencia de Sir2, las histonas no son las únicas dianas de su acción, sino que Sirt1 es capaz de deacetilar a un número muy elevado de proteínas, entre las que se han descrito proteínas muy importantes en la regulación y el control de procesos como el cáncer, la inflamación y el metabolismo. Y, aunque sería inabarcable en la presente Introducción hablar de todas ellas, sí que es necesario profundizar en la relación de Sirt1 con alguna de estas proteínas, por la importancia que tuvieron para el diseño, obtención e interpretación de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral.

III.2.1. Sirt1 y p53

La proteína p53 es uno de los genes supresores de tumores más importantes (Efeyan and Serrano, 2007), de forma que se encuentra mutado aproximadamente en un 50% de los tumores humanos y, en particular, es una de las proteínas más extensamente estudiadas en el laboratorio de Manuel Serrano.

De forma interesante, los primeros estudios sobre Sirt1 demostraron que Sirt1 es capaz de interaccionar con p53 y deacetilarlo (Luo *et al.*, 2001; Vaziri *et al.*, 2001). Esta deacetilación de p53 tiene un efecto inhibitorio sobre su función, de modo que disminuyen los niveles de apoptosis frente a distintos tipos de estrés como el daño en el ADN o el estrés oxidativo, aumentando así la supervivencia celular. Este hecho llevó a muchos investigadores a postular que dicho aumento en la supervivencia celular frente al estrés podría extrapolarse al envejecimiento

humano, de forma que Sirt1 podría estar inhibiendo la senescencia y la apoptosis dirigida por p53, y esto provocaría una mayor supervivencia celular. Sin embargo, esta hipótesis acarrearía simultáneamente que Sirt1, a través de dicha inhibición de p53, podría funcionar como un oncogén *in vivo*, lo que debería producir repercusiones evidentemente negativas sobre el envejecimiento.

III.2.2 Sirt1 y NFκB

El factor de transcripción NFκB es un regulador crucial de múltiples procesos celulares como la adhesión celular, el ciclo celular, la angiogénesis o la apoptosis. Además, es uno de los principales responsables de desencadenar las respuestas inflamatorias en el organismo, así como de determinar la supervivencia o la muerte celular frente a dichos estímulos (Karin and Lin, 2002).

De forma importante, se demostró que Sirt1 es capaz de interactuar con la subunidad RelA/p65 de NFκB y deacetilarlo de forma específica en el residuo de lisina 310. Dicha deacetilación se traduce en una menor capacidad de transactivación de NFκB. Así, en respuesta a estímulos como el TNF-α, la sobreexpresión de Sirt1 o su activación con resveratrol pueden reprimir las señales de supervivencia que desencadena NFκB en dichas células de forma que en este caso, y de forma contraria a lo que ocurría antes con p53, Sirt1 favorecería la muerte celular inducida por TNF-α (Yeung *et al.*, 2004).

III.2.3. Sirt1 y otros factores de transcripción

Además de su relación con p53 y con NFκB, diversos estudios han descrito importantes funciones para Sirt1 en la regulación de la función de otros factores de transcripción. Por ejemplo, Sirt1 es capaz de reprimir la actividad transcripcional de PPARγ, que es un factor muy importante para la acumulación de grasa en el tejido adiposo, de forma que la sobreexpresión o la inhibición de Sirt1 en adipocitos 3T3-L1 es capaz de atenuar o aumentar la lipogénesis, respectivamente, hecho que llevó a especular nuevamente con que el efecto positivo en la longevidad pudiera deberse, al menos en parte, a la menor acumulación de grasa (Picard *et al.*, 2004).

Adicionalmente, también se describió que Sirt1 puede controlar la respuesta celular al estrés oxidativo a través de la regulación de miembros de la familia Foxo, de forma que Sirt1 deacetila a Foxo3 en respuesta a dicho estrés, promoviendo parada del ciclo celular y aumentando la supervivencia celular (Brunet *et al.*, 2004).

III.2.4. Sirt1 y respuesta a la disponibilidad de nutrientes

Los indicios de que Sir2 podría mediar los efectos de la restricción calórica en organismos modelos llevaron a investigar también la posible relación entre la deficiencia de nutrientes *in vitro* en el medio de cultivo y la proteína Sirt1. Así, se sugirió que los niveles de Sirt1, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína, aumentaban al utilizar un medio de cultivo sin glucosa y sin suero. Además, dicho aumento parecía estar mediado a su vez por un complejo formado por Foxo3 y p53, de forma que parecía establecerse una interrelación aun más estrecha entre las tres proteínas (Nemoto *et al.*, 2004).

III.3. Sirt1: datos *in vivo*

La mayoría de los datos que se sabían sobre Sirt1 antes de comenzar la presente Tesis Doctoral eran datos obtenidos *in vitro*, sin embargo, el gran interés que despertó esta proteína hizo que muchos grupos se interesasen por investigar sus efectos *in vivo* y es necesario mencionar aquí los datos que se conocían de dichos efectos antes de empezar nuestro estudio.

III.3.1. Ratones Sirt1 *knock-out*

Dos grupos independientes de investigadores generaron simultáneamente ratones deficientes para la proteína Sirt1 (Cheng *et al.*, 2003; McBurney *et al.*, 2003). Ambos estudios demostraron que la deficiencia de Sirt1 provoca una elevada letalidad embrionaria mientras que los animales que conseguían sobrevivir presentaban defectos en su desarrollo. Así, estos animales mostraban menor peso corporal, microftalmia, defectos cardíacos, defectos óseos y esterilidad. De forma interesante, uno de dichos estudios demostró adicionalmente que estos ratones mostraban una hiperacetilación de p53, lo que se reflejaba en una mayor apoptosis en los timocitos Sirt1-KO tras tratamiento con radiación ionizante (Cheng *et al.*, 2003), en concordancia con los datos comentados anteriormente sobre Sirt1 y p53 obtenidos en células en cultivo, lo que sugería nuevamente un posible rol oncogénico para Sirt1, aunque estudios posteriores no consiguieron confirmar dicho efecto (Kamel *et al.*, 2006). En cualquier caso, debido a la elevada letalidad embrionaria y a los defectos en el desarrollo, ninguno de los dos estudios pudo investigar la susceptibilidad a desarrollar cáncer ni el envejecimiento de dichos animales.

Más adelante, otro estudio utilizando estos mismos ratones Sirt1-KO sugirió que Sirt1 mediaba también en mamíferos los efectos asociados a la CR. En dicho estudio no llegaron a investigar la longevidad de dichos ratones, pero si comprobaron que, al tratarlos con CR, los ratones Sirt1-KO no mostraban un aumento en su actividad motora, característica que es típica de la CR y que sí se da en ratones wt (Chen *et al.*, 2005), resultado que fue corroborado posteriormente (Boily *et al.*, 2008).

III.3.2. Ratones que sobreexpresan Sirt1 en páncreas

Aunque previamente al presente estudio no se había generado ningún ratón transgénico que sobreexpresase Sirt1 en todo el organismo, sí se había publicado una línea de ratón que presentaba una sobreexpresión de Sirt1 específicamente en las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans. En dicho estudio se demostró que dicha sobreexpresión aumentaba la liberación de insulina por parte

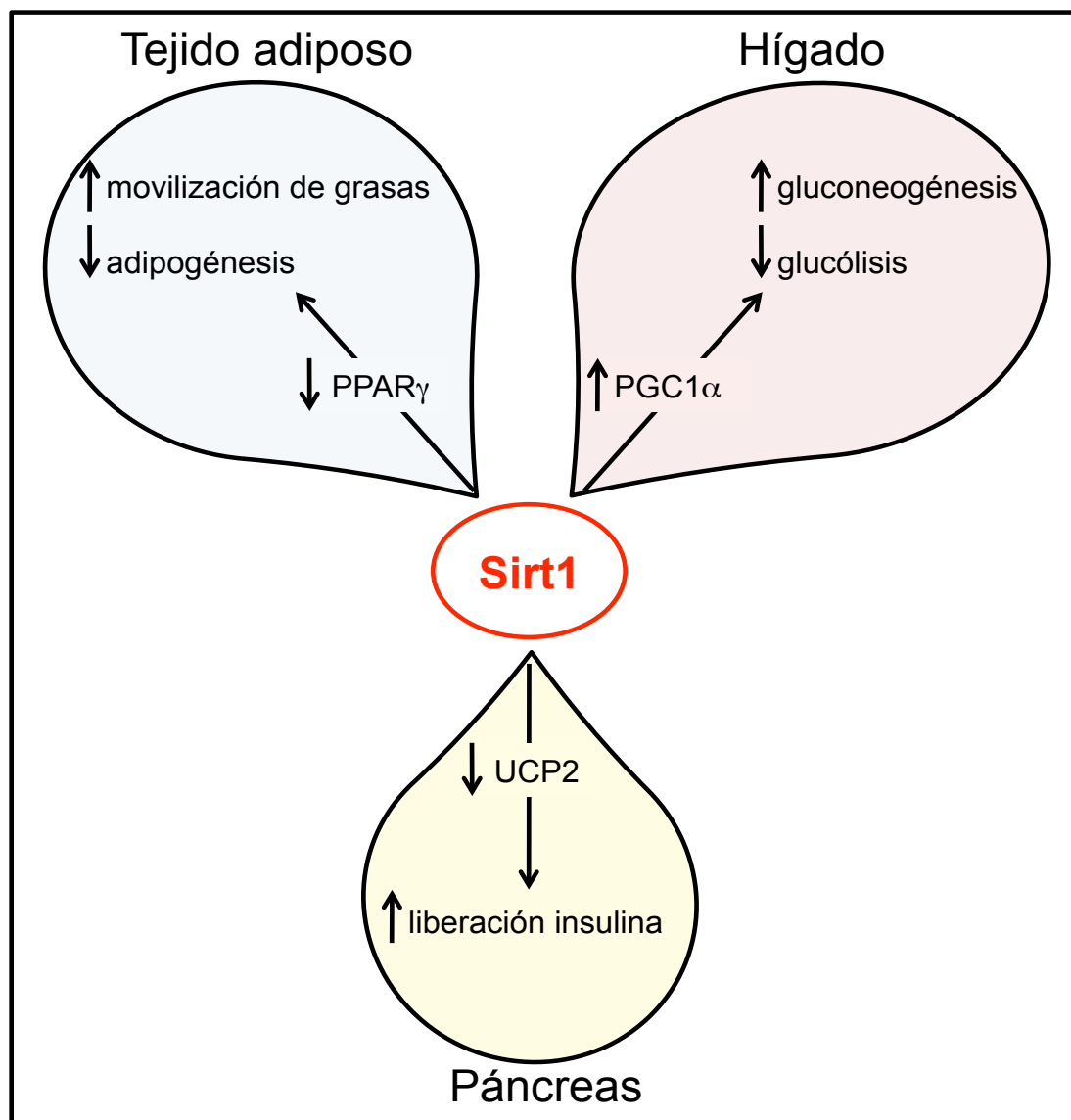


Figura 5. Resumen de las funciones metabólicas atribuidas a Sirt1.

del páncreas en respuesta a la glucosa. El mecanismo propuesto para explicar dicho efecto fue la represión de UCP2 por parte de Sirt1 de forma que, al disminuir UCP2, disminuye también el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, lo que causa un aumento en la producción de ATP que se traduce finalmente en mayor liberación de insulina (Moynihan *et al.*, 2005). Dicho trabajo fue uno de los primeros en sugerir que la activación de Sirt1 podría ser beneficiosa para el tratamiento de la *diabetes mellitus* tipo II.

III.3.3. Sirt1, restricción calórica y ayuno : PGC1 α , Ku-70 y AMPK

Teniendo en mente todos los datos que se tenían en organismos modelo que ligaban a Sir2 con la CR y, conociendo a su vez el dato de que los niveles de Sirt1 aumentan en células en cultivo en respuesta a un déficit de nutrientes, no tardó en investigarse también la importancia de Sirt1 en la respuesta *in vivo* frente al ayuno. Así, se descubrió que los niveles de Sirt1 aumentan *in vivo* en el hígado, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína, en respuesta al ayuno (Rodgers *et al.*, 2005). Esta inducción de Sirt1 en el hígado se ve acompañada de la interacción entre Sirt1 y PGC1 α , que es un regulador central del metabolismo. Sirt1 deacetila a PGC1 α y esto provoca la inducción de genes gluconeogénicos y la consiguiente liberación de glucosa al torrente sanguíneo por parte del hígado. Más aún, la CR en ratas se comprobó que era capaz de aumentar los niveles de Sirt1 en numerosos tejidos, y esto se veía acompañado de una mayor deacetilación de Ku70 y la consiguiente inhibición de la apoptosis mediada por Bax, aumentando así nuevamente la supervivencia celular (Cohen *et al.*, 2004). Por otra parte, estudios posteriores han relacionado a Sirt1 con AMPK, que es una proteína que detecta los cambios en el ratio AMP/ATP y cuya actividad se ve elevada habitualmente en respuesta a déficit de nutrientes. Así, Sirt1 podría activar a AMPK a través de la deacetilación y activación de LKB1, que a su vez fosforila y activa a AMPK (Hou *et al.*, 2008; Lan *et al.*, 2008) y, adicionalmente, AMPK podría también activar a Sirt1 de forma indirecta a través del aumento en la β -oxidación mitocondrial, que a su vez produciría un aumento en el ratio NAD⁺/NADH que activaría a Sirt1 (Canto *et al.*, 2009; Canto *et al.*, 2010)

III.3.4. Sirt1 y síndrome metabólico

La relación tan íntima entre Sirt1 y la CR que sugerían todos los datos ya comentados hizo que algunos investigadores llevaran algo más allá las especulaciones y, de la misma forma que el aumento de la longevidad en respuesta

a la falta de nutrientes podría intentar explicarse evolutivamente como una respuesta adaptativa del organismo de búsqueda activa de nutrientes y optimización en su uso, pudiendo estar mediado dicho efecto por Sirt1, podría ser también que el exceso de nutrientes estuviera colocado al otro extremo de la balanza, de forma que en periodos de abundancia de nutrientes, el organismo tendería a acumular grasa, y esto podría implicar una inhibición de Sirt1, que estaría controlando así el equilibrio de la balanza. De hecho, algo similar es lo que podría estar ocurriendo ahora mismo en el mundo occidental, en donde la prevalencia del llamado *síndrome metabólico* es del 25%, siendo la inactividad física y la dieta poco saludable y abundante en grasas los detonantes de la aparición de dicho síndrome, y siendo característicos de este síndrome la combinación de inflamación, obesidad, hipertensión arterial, dislipidemia, intolerancia a la glucosa y, finalmente, *diabetes mellitus* tipo II, parámetros que son prácticamente los opuestos a los observados en el caso de la CR como se puede observar en la **Figura 6**. Todo esto, llevó a especular con el posible beneficio que podría reportar Sirt1 junto con PGC1 α (uno de sus targets ya comentados anteriormente) o AMPK (cuya interrelación con Sirt1 hemos comentado ya también) frente al desarrollo de síndrome metabólico (Guarente, 2006).

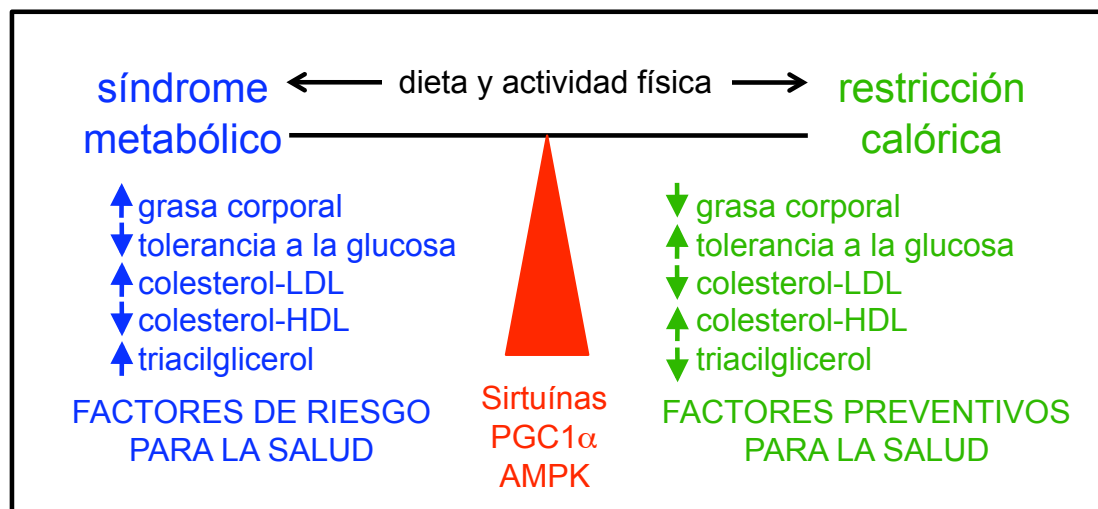


Figura 6. El síndrome metabólico y la restricción calórica podrían encontrarse en extremos opuestos de la balanza e influenciados por la dieta y la actividad física a través de reguladores como las sirtuínas, PGC1 α o AMPK. Figura adaptada de Guarente, 2006.

IV. Sirt1 y cáncer

Al comienzo del presente estudio, había pocos datos sobre la relación entre Sirt1 y el desarrollo de cáncer y, además, eran en muchos casos contradictorios. Por una parte, no había modelos animales en los que se hubiera manipulado

genéticamente Sirt1 y se hubiera investigado la susceptibilidad al desarrollo de cáncer. Los ratones Sirt1-KO se habían generado recientemente, y su elevada letalidad embrionaria no permitió llevar a cabo ensayos de cáncer en ellos. Por otra parte, no se habían publicado aún ratones que sobreexpresaran Sirt1, más allá de los ratones transgénicos mencionados anteriormente en los que Sirt1 se encontraba sobreexpresado en el páncreas.

Así, la mayoría de los datos que podían ligar a Sirt1 y cáncer venían de estudios realizados *in vitro*. En primer lugar, los estudios mencionados anteriormente en los que se demostraba que Sirt1 era capaz de inhibir a p53 sugerían un rol oncogénico para Sirt1 (Luo *et al.*, 2001; Vaziri *et al.*, 2001). Más aún, el tratamiento de células tumorales con inhibidores de Sirt1 como el sirtinol, generaba una parada en el ciclo celular con características remanentes a la senescencia (Ota *et al.*, 2006), lo que hacía especular de nuevo con un papel pro-tumoral para Sirt1. Adicionalmente, un estudio publicado al poco de comenzar la presente Tesis Doctoral demostró que la inhibición de Sirt1 en diversas líneas tumorales era suficiente para reactivar la expresión de genes supresores tumorales que se encontraban silenciados epigenéticamente en dichas líneas (Pruitt *et al.*, 2006). Además, los resultados comentados anteriormente de inhibición de las funciones apoptóticas de Bax a través de Sirt1 y Ku70, así como el aumento en la supervivencia por

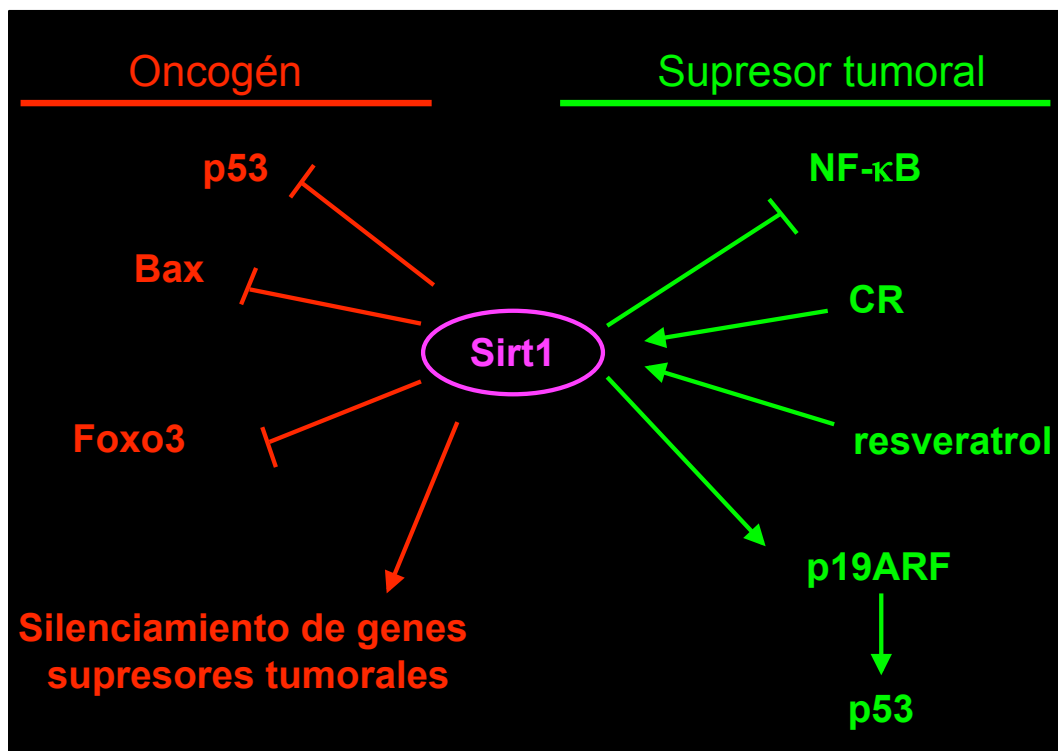


Figura 7. Resumen esquemático de los datos que ligaban a Sirt1 con el cáncer, tanto sugiriendo una función oncogénica como sugiriendo una acción supresora de tumores, previos a la presente Tesis Doctoral.

deacetilación de Foxo3, podrían interpretarse también como potencialmente oncogénicos (Brunet *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2004).

Por el contrario, los datos que se tenían *in vivo* con el uso de resveratrol sugerían por su parte un papel protector frente al desarrollo de cáncer (Jang *et al.*, 1997). Más aún, se había demostrado con anterioridad que la CR era capaz de proteger frente al desarrollo de cáncer en ratones deficientes en p53 (Berrigan *et al.*, 2002; Hursting *et al.*, 1994). Por otra parte, la inhibición observada *in vitro* de NFκB por Sirt1 podría conferir protección frente al desarrollo de diversos tipos de cáncer (Yeung *et al.*, 2004). Y, adicionalmente, un estudio publicado al poco de haber comenzado nuestro estudio sugería que Sirt1 era necesario para el correcto funcionamiento de p19ARF, uno de los genes supresores tumorales prototípicos y que, a su vez, activa a p53 (Chua *et al.*, 2005). Todos estos datos (resumidos esquemáticamente en la **Figura 7**) generaron una gran controversia en cuanto al posible papel de Sirt1 en el desarrollo de cáncer y generaron grandes expectativas en la comunidad científica por conseguir elucidar *in vivo* los efectos de Sirt1 sobre la generación de patologías cancerosas.

Conviene añadir ahora que, más adelante en el tiempo, y durante la realización del presente estudio, sí que se publicaron estudios ligando a Sirt1 y cáncer *in vivo* (que trataremos más detalladamente en los apartados de Resultados y Discusión), de forma que la sobreexpresión de Sirt1 protegería del desarrollo de linfomas en ratones heterocigotos para p53 (Oberdoerffer *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008), así como del desarrollo de pólipos intestinales en el modelo APC^{min} (Firestein *et al.*, 2008) pero, por el contrario, otro estudio usando ratones Sirt1-KO no pudo constatar en este caso mayor incidencia de tumores en el modelo APC^{min} (Boily *et al.*, 2009).

Conociendo todos los datos comentados con anterioridad y teniendo en cuenta el particular interés del laboratorio de Manuel Serrano en el estudio tanto del envejecimiento, como de p53 y el resto de genes supresores de tumores (Matheu *et al.*, 2007), nos decidimos a investigar más en profundidad el papel de Sirt1 en procesos como el cáncer, el metabolismo y el envejecimiento en mamíferos. Para ello, nos propusimos obtener líneas de ratones que sobreexpresasen Sirt1 en todo el organismo, de forma que, una vez conseguidas dichas líneas, podríamos investigar *in vivo* el efecto de sobreexpresar Sirt1 en el desarrollo de cáncer, podríamos asimismo intentar demostrar si Sirt1 media los efectos de la CR en mamíferos, así como determinar el efecto de dicha sobreexpresión sobre el metabolismo y el envejecimiento de dichos animales.

Objetivos

1. Generar líneas de ratones que sobreexpresen moderadamente la proteína Sirt1, de manera sistémica y homogénea, de forma que constituyan un modelo de intervención farmacológica dirigida selectivamente a aumentar los niveles de Sirt1.
2. Sirviéndonos de los modelos generados, explorar y profundizar en el conocimiento de las funciones de Sirt1 en el control y regulación del metabolismo en mamíferos.
3. Determinar en dichas líneas el impacto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la longevidad, el envejecimiento y sus enfermedades asociadas.
4. Estudiar en profundidad el impacto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre el desarrollo de cáncer, tanto inducido químicamente mediante el uso de carcinógenos, como inducido de forma genética mediante el cruce con líneas de ratón proclives a desarrollar distintos tipos de tumores.

Materiales y métodos

I. Cultivos celulares

I.1. Tipos celulares y condiciones de cultivo

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) se obtuvieron a partir de hembras a día 13,5 de gestación, con los genotipos que se indican en cada experimento. El fondo genético de los MEFs usados en este trabajo es una mezcla CBA ($\leq 12,5\%$) y C57BL/6 ($\geq 87,5\%$) y todos los MEFs utilizados son de pase temprano (menos de 3 pases). Las líneas celulares derivadas de tumores de tiroides WRO-1 y FRO-1 fueron donadas amablemente por la Dra. Pilar Santisteban (IIB). Para la producción de virus ectópicos se utilizaron células 293T. Las células U2OS provenían de stocks de nuestro propio laboratorio.

Los MEFs y las células U2OS se crecieron en DMEM (Gibco) mientras que las células tumorales WRO-1 y FRO-1 se crecieron en RPMI (Gibco); en todos los casos, los medios estaban suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB, Hyclone) y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco) y las células se mantuvieron en incubadores a 37°C y con un 5% de CO₂.

I.2. Preparación de fibroblastos embrionarios de ratón

13,5 días tras la observación de tapón vaginal en cruces de ratones de los genotipos deseados, se sacrificó a la hembra y se extrajeron los cuernos uterinos con los embriones. Se extrajeron los embriones del útero y del saco vitelino, manteniéndose en todo momento suspendidos en PBS suplementado con 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco) a temperatura ambiente. Una vez individualizados, se separaron las cabezas (que posteriormente sirvieron para extraer el ADN para genotipar) y se desecharon igualmente las vísceras. Los cuerpos se dispusieron en placas individuales de 60mm de diámetro conteniendo 1ml de tripsina-EDTA 2x en PBS y se disgregaron mecánicamente usando hojas de bisturí. Tras 20 minutos de incubación con la tripsina-EDTA a 37°C, se pasó cada embrión por una pipeta Pasteur para disgregar aún más el tejido, y posteriormente se incubaron nuevamente durante 20 minutos en la misma tripsina-EDTA a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se sembró cada embrión en una botella T75. El día siguiente se cambió el medio de cada botella y, tras 1-2 días, se tripsinizaron las células adheridas (ya confluentes y con morfología de fibroblasto) y se pasaron a

una botella T150. Transcurridos 2-3 días, se tripsinizaron y congelaron en alícuotas de 4-5 millones de células usando 90% de SFB (Hyclone) y 10% de DMSO (Sigma). Estos MEFs se consideraron pase 0.

I.3. Infección retroviral de MEFs

Los plásmidos retrovirales indicados en cada experimento se cotransfectaron junto con el vector pCL-Eco, que codifica las proteínas retrovirales gag, pol y env, siendo ésta última la variante ecotrópica de MoMLV (*Moloney murine leukemia virus*), en células 293T usando Eugene 6 (Roche) como reactivo, siguiendo las instrucciones del proveedor. Pasados 2 días, se filtró el sobrenadante con un filtro de 45 µm, se le añadió polibreno (dilución 1:1000) y se añadió a las placas con los MEFs diana. Esta adición de sobrenadante se repitió esa misma tarde y también a la mañana siguiente, tras lo cual se mantuvieron los MEFs en un medio conteniendo los antibióticos adecuados (puromicina, higromicina o neomicina) para la selección de las células infectadas, según fuera el gen de resistencia a antibiótico codificado en cada plásmido.

I.4. Formación de focos en MEFs

Se infectaron MEFs con los vectores pLXSN-neo-E6 junto con pLPC-puro-H-Ras^{V12} o pWZL-blastF-MiddleT. Pasados los 3 días de selección con los antibióticos correspondientes, se tripsinizaron y contaron los MEFs, y se sembraron posteriormente 20000 células en placas de 10 cm de diámetro y por triplicado. El medio se cambió 2 veces por semana y, pasadas 2-3 semanas, se fijaron las células añadiendo 2 mL de formaldehído al medio de cultivo durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante y se tiñeron las células con una solución de Giemsa (Sigma) diluida 1:20 en PBS durante 30 minutos, tras lo cual se lavaron las placas con agua y se dejaron secar para el posterior recuento del número de colonias por placa. Se consideraron colonias a los cúmulos compactos de células de más de 1mm de diámetro.

I.5. Ensayos de proliferación en células tumorales

Se sembraron 50000 células por triplicado en placas de 6 pocillos, y se cultivaron durante 1 ó 2 días con distintas concentraciones de salermida (Cayman) o con DMSO (Sigma) como control. Una vez transcurridos los tiempos indicados, se tripsinizaron y contaron las células.

I.6. Ensayos del gen reportero luciferasa

Se sembraron 10000 MEFs de los genotipos indicados en placas de 96 pocillos y, a la mañana siguiente, se transfectaron usando Eugene 6 (Roche) o Lipofectamine LTX y Plus Reagent (Invitrogen), con el vector pNF κ B-Luc (Promega) más el vector pBabe-E1F α -Renilla como control de transfección, así como con los diferentes plásmidos que se indican en cada experimento. Transcurridos 2 días tras la transfección, se trataron las células con TNF- α (Promega) o se dejaron sin tratamiento, como control; a las 6 horas se procesaron usando el Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se midió la actividad luciferasa usando un luminómetro Glomax (Promega). Se realizaron 3 réplicas por cada punto, y los valores de actividad luciferasa se relativizaron usando la actividad Renilla como control de transfección en cada caso.

El plásmido codificando un shRNA contra Dnajc12 (5'-GTTGTAGTTTATTTC AATA-3') se diseñó utilizando el software iRNAi y se clonó en el vector pRetro-Super.

I.7. Ensayos de reparación del daño en el ADN en MEFs

La cinética de fosforilación de H2AX en los MEFs indicados se midió tras tratar las células con neocarzinostatina durante 1 hora (100 ng/mL), tras lo cual fueron lavadas y dejadas con medio normal sin neocarzinostatina. Se adquirieron las imágenes a los distintos tiempos indicados tras el tratamiento usando un microscopio confocal de alto rendimiento.

I.8. Ensayos de sobreexpresión en células U2OS

Los ensayos de sobreexpresión en células U2OS se realizaron utilizando Eugene (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante, y utilizando plásmidos que codificaban la forma wt de p110 α y/o AKT, disponibles en nuestro laboratorio, así como un plásmido que codificaba para PTEN (10750, Addgene) y plásmidos que codificaban para Sirt1 wt (1791, Addgene) o Sirt1 mutado H363Y (1792, Addgene).

I.9. Ensayos de silenciamiento de Sirt1 en células de tiroides

Se utilizó un siRNA contra Sirt1 (SiGenome Smartpool M-003540-01, Dharmacon) en las líneas celulares tumorales de tiroides WRO-1 y FRO-1 utilizando Dharmafect 1, siguiendo las instrucciones del proveedor.

II. Experimentos con ratones

II.1 Generación de las líneas de ratones que sobreexpresan Sirt1

Los animales transgénicos que sobreexpresan Sirt1 se generaron mediante protocolos estándar (Garcia-Cao et al., 2002). Se seleccionaron 2 clones diferentes (RP23-119G23 ó tgA y RP24-306L15 ó tgB) de una librería comercial (CHORI) de cromosomas artificiales de bacteria o BACs que contenían un fragmento grande del genoma del ratón que contenía a su vez el gen Sirt1. Los plásmidos se purificaron utilizando el Large-Construct kit (Quiagen). Las secuencias terminales (~300bp) se determinaron con oligonucleótidos complementarios a las secuencias T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAT-3'), que son los elementos de los vectores que flanquean a los respectivos insertos, y se compararon con la base de datos de NCBI. Para la transgénesis, los BACs se linearizaron con la enzima de restricción PI-SceI (New England Biolabs), que presentaba un sitio de corte único y adyacente al extremo T7 del inserto genómico. Se inyectaron aproximadamente 2 pL de una solución de ADN (1 ng/ μ L) conteniendo los BACs linearizados en los pronúcleos de oocitos fertilizados derivados de cruces

entre ratones CBA x C57BL/6. Las camadas resultantes se genotiparon por PCR para detectar la presencia del transgén por ambas secuencias terminales, utilizando los oligonucleótidos:

Extremo T7 en la línea tgA:

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

5'-AGCTTCTTGACACACCACATGGAGTT-3'

Extremo T7 en la línea tgB:

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

5'-TTGATCTGGATCTTGAGGCATGGC-3'

Región de vector cercana al extremo SP6 en la línea tgA :

5'-AGATAGTTCACCGGGGTGAGAA-3'

5'-TTCGGTCGA AGAGTATCTGGTG-3'

Región de vector cercana al extremo SP6 en la línea tgB :

5'-ACTCTTTAACCGGCCCTTACAAG-3'

5'-TCCTGTGGATCTACCCACTAGTCA-3'

La reacción de PCR utilizada es la siguiente : 3 minutos a 94°C ; 35 repeticiones de los siguientes pasos : 40 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 40 segundos a 72°C. Finalmente, 8 minutos de elongación a 72°C.

Para el genotipado sistemático posterior de ambas colonias se utilizaron únicamente las reacciones para los extremos SP6.

II.2. Mantenimiento de las colonias de ratones

Todos los animales se mantuvieron en el área de barrera, libre de patógenos, del CNIO, a excepción de los animales utilizados en los ensayos de fenotipado metabólico, que fueron mantenidos en el área libre de patógenos de la Universidad de Cincinnati. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar (2018 Teklad Global en el caso de los animales mantenidos en el CNIO; Harlan-Teklad LM-485 en el caso de los animales mantenidos en Cincinnati; en ambos casos, el 17% de la energía proviene de la grasa) o con una dieta rica en grasas (HFD,

Research Diets 12451, en la que el 45% de la energía proviene de la grasa), como se indica en cada experimento concreto.

II.3. Fenotipado metabólico de los ratones

La actividad metabólica (ingesta y gasto energético) y la actividad locomotora se estudiaron usando un sistema de calorimetría indirecta (TSE Systems, GmbH). Previo al experimento, se dejó aclimatar a los ratones a las jaulas durante 16 horas y, seguidamente, se midió el consumo de O₂ así como la producción de CO₂ cada 45 minutos, durante 4 fases de luz y 4 fases de oscuridad (100 horas de seguimiento en total). El cociente respiratorio y el gasto energético se calcularon usando software estándar. De forma simultánea, se determinaron la ingesta de agua y comida y, en paralelo, la actividad locomotora se determinó utilizando un sistema multidimensional de luz infrarroja con haces de luz instalados en la parte superior e inferior de las jaulas, y expresándose la actividad por las interrupciones en los haces de luz. La actividad motora en estado estacionario se definió como la interrupción consecutiva de un mismo haz de luz, y el movimiento ambulatorio como la interrupción consecutiva de 2 haces de luz diferentes.

Para el test de la tolerancia a la glucosa (GTT), se sometió a los ratones a 6 horas de ayuno, y fueron posteriormente inyectados intraperitonealmente con 2 g/kg de glucosa (Sigma). El test de tolerancia a la insulina (ITT) se realizó de forma similar, tras ayuno de 6h y posterior inyección de 0,75 IU/kg (Eli Lilly and Co., Humalog Insulin). El test de tolerancia al piruvato (PTT) se realizó inyectando 2 g/kg de piruvato sódico (Sigma) tras un ayuno inicial de 6 horas. En todos los tests, los niveles de glucosa en sangre se determinaron con un glucómetro (Therasense Freestyle o también A. Menarini Diagnostics) a los tiempos indicados.

Los niveles de insulina en sangre se determinaron utilizando el Ultra-Sensitive Mouse Insulin ELISA kit (Chemicon) o también usando el Sensitive Rat Insulin RIA (Linco Research).

Los niveles de colesterol en sangre se determinaron usando Infinity Cholesterol reagent, mientras que los niveles de triglicéridos se determinaron usando Infinity Triglyceride reagent (Thermo Electron).

Los ácidos grasos no esterificados libres en sangre se determinaron el kit NEFA C (Wako).

Los niveles de leptina y adiponectina en sangre se determinaron usando Quantikine Mouse leptin and adiponectin immunoassays (R&D Systems), respectivamente.

La composición corporal (total de masa grasa y total de masa magra) de los ratones se midió usando un sistema de Resonancia Magnética Nuclear (EchoMRI)

II.4. Ensayos de salud en el envejecimiento

La determinación de la densidad mineral ósea se realizó por microtomografía computerizada (microCT; eXplore Vista PET/CT, GE).

El ensayo de cicatrización se realizó utilizando bisturís de biopsia de 4 mm de diámetro con los que se hicieron las heridas en la piel de la espalda. La cicatrización se determinó a las 48 horas entre 2 investigadores ciegos para el experimento, siguiendo una gradación semi-cuantitativa: 0 para las heridas bien cicatrizadas, secas y prácticamente cerradas; 2 para las heridas todavía húmedas y totalmente abiertas; y 1 para las heridas que presentaban un aspecto intermedio.

El ensayo de coordinación neuromuscular se realizó colocando a los ratones encima de una barra de sección circular (60 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro) y se consideró que un ratón superaba el test cuando era capaz de permanecer sobre dicha barra más de 1 minuto a lo largo de 5 intentos consecutivos.

II.5. Obtención y procesamiento de muestras de ratón

Todos los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂ siguiendo las normas de bioética del CNIO. Los distintos órganos en cada caso se extrajeron frescos y se procesaron según el experimento para el que se necesitaran: para la obtención de proteínas o ARN, se introdujeron en tubos Eppendorff estériles y se congelaron en nieve carbónica, para almacenarlos posteriormente a -80°C hasta su procesamiento; para las tinciones con hematoxilina y eosina (H/E) y para inmunohistoquímica (IHQ), los órganos se fijaron no menos de 12 horas y no más de 72 horas en formalina tamponada al 10% (Invitrogen), se deshidrataron e incluyeron en bloques de parafina; para los experimentos de unión a cromatina en hepatocitos, se aislaron los hepatocitos frescos tras sacrificar al animal siguiendo protocolos estándar (Pichard *et al.*, 2006), se filtraron a través de un colador de células de 70 µm de tamaño de poro, y posteriormente se aisló la cromatina como se ha descrito ya anteriormente (Mendez and Stillman, 2000).

II.6. Histología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Para la tinción de muestras fijadas en parafina, cortes de 5 μm se montaron en portaobjetos de poli-L-Lisina y se rehidrataron. Los portas destinados a tinción con H/E se tiñeron en este paso, mientras que los destinados a IHQ se sometieron a un proceso de exposición antigénica en olla a presión en 10 mM de tampón citrato. Cualquier actividad peroxidasa endógena se eliminó incubando los portas en peróxido de hidrógeno y en metanol, y se tiñeron los portas con los anticuerpos primarios en cada experimento. Las células positivas se detectaron mediante procedimientos estándar de actividad inmunoperoxidasa indirecta (LSAB, DakoCytomation). La cuantificación de células positivas (tinción de γH2AX , BrdU y TUNEL) en el ensayo de tratamiento con dietilnitrosamina (DEN) a tiempo corto se hizo contando las células positivas en al menos 5 campos de 20 aumentos que contuvieran simultáneamente una vena central (VC) y una tríada portal (TP), y relativizando posteriormente dicho dato al número de células positivas detectadas en los ratones wt siguiendo el mismo protocolo. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: Sirt1 (S5196, Sigma), BrdU (BU-1, GE Healthcare), γH2AX (JBW301, Millipore).

La detección de células apoptóticas por TUNEL en hígado se realizó por hibridación in situ utilizando el kit ApoTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore).

Para la detección de focos de 53BP1 por inmunofluorescencia en hígado, una vez sometidos los cortes al proceso de exposición antigénica, se permeabilizaron las muestras mediante tratamiento con una solución de tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloquearon durante 1 hora a 37°C con una solución de albúmina de suero bovina (BSA) al 5% en PBS. A continuación, se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo contra 53BP1 (NB100-304, Novus Biologicals, dilución 1:500) y se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario fluorescente (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), marcado con Cy3, en una dilución 1:400. Se lavaron 5 veces con PBS, se dejaron secar y se montaron con medio de montaje Vectashield con 4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) a 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (Vector Laboratories). La captura digital de las imágenes se realizó en el microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS-UV.

II.7. Ensayos de sensibilidad al LPS

La sensibilidad al lipopolisacárido bacteriano (LPS; serotipo 0111:B4, Sigma) se determinó inyectando intraperitonealmente a los ratones con 20 mg/kg de LPS disuelto en PBS (1,2 mg/mL), y monitorizándoles cada 8 horas durante un periodo de 72 horas.

II.8. Ensayos de respuesta a tiempo corto al DEN

Los ensayos de respuesta a tiempo corto frente a la dietilnitrosamina (DEN) se realizaron en ratones de menos de 3 meses de edad, a los que se les inyectó 100 mg/kg de DEN disuelta en PBS (15 mg/mL). Los niveles de la alanina-transaminasa (ALT) en sangre se determinaron utilizando los rotores VetScan® Comprehensive Diagnostic Profile (Abaxis).

II.9. Carcinogénesis química por DEN/HFD

En este modelo de carcinogénesis, se inyectaron 5mg/kg de DEN disueltos en PBS (15 mg/mL) en machos de 16 días de edad y, tras el destete a los 21 días de edad, se les mantuvo alimentados con dieta rica en grasa (HFD) hasta el final del estudio. Los animales fueron supervisados diariamente y el número y tamaño de los tumores se determinó a los 11 meses utilizando microCT.

II.10. Carcinogénesis química por 3MC

Animales menores de 3 meses de edad fueron tratados en una de las patas traseras con una única inyección intramuscular de 1 mg de 3-metil-colantreno (3MC, Sigma) disuelto en 100 µL de aceite de maíz (10 µg/µL). Los animales fueron supervisados diariamente y sacrificados cuando el tumor mostraba un tamaño de 2 cm de diámetro.

II.11. Activación de Cre-ER en ratones transgénicos y determinación de lesiones en pulmón

Ratones heterocigotos para la proteína híbrida Cre-ER fueron sometidos a una única inyección intraperitoneal de 4-hidroxi-tamoxifeno (4OHT; 0,5 mg en 100 μ L de aceite de maíz) a los 20-30 días de edad, y el tamaño y número de los tumores de pulmón se determinó utilizando microCT a partir de los 7 meses del tratamiento.

III. Métodos bioquímicos

III.1. Southern Blot

La técnica de Southern Blot se usó para detectar la integración de los BACs así como el número de copias insertadas. Para ello, se aisló ADN de colas de ratón tras digestión con proteinasa K y posterior extracción con fenol/cloroformo (Ambion). Tras ello, se usaron 5 μ g de ADN en cada caso, digeridos con las enzimas de restricción (New England Biolabs) correspondientes y se resolvieron en geles de agarosa al 0,7% en TBE. Posteriormente se transfirieron a membranas Hybond-N⁺ (Amersham), que fueron pre-hibridadas usando Hibrisol (Chemicon) y se marcaron a continuación con las sondas correspondientes en cada caso.

Las sondas se marcaron utilizando el kit DECAprime II (Ambion), y fueron obtenidas previamente por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Sirt1 sonda número inserciones:

5'- AGTCTTCACTTCCCCTCAGA -3'

5'- AAGAAGTGGGGGAGAGCATA -3'

Sirt1 sonda número copias:

5'-TCCAAACAGGCCCTGAGACTAAT-3'

5'-AACAGGCAACAGTGTACTTTCTGG-3'

Sonda Igf1:

5'-ACACCCTTCCTAACACTTG-3'

5'-TTAGGCTCCAGGCTTTCGTT-3'

Tras la hibridación y los correspondientes lavados, la señal fue detectada con películas Biomax (Kodak).

III.2. Northern Blot

Se obtuvo ARN total de tejidos mediante el protocolo de extracción con Trizol (Gibco), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Posteriormente, se resolvieron 10 µg de ARN en geles desnaturalizantes de agarosa al 1% en MOPS y se transfirieron a membranas Hybond-N (Amersham). El proceso de pre-hibridación, marcaje y revelado fue el mismo seguido en el caso del Southern Blot. Las sondas utilizadas se generaron por PCR a partir de los siguientes oligonucleótidos:

Sonda Sirt1:

5'-TCCAAACAGGCCCTGAGACTAAT-3'

5'-AACAGGCAACAGTGTACTTTCTGG-3'

Sonda Gapdh:

5'-TCTTCTTGTGCAGTGCCAGC-3'

5'-CAGTAGACTCCACGACATAC-3'

III.3. Western Blot

Para obtener proteínas a partir de células en cultivo, se lavó la placa 3 veces con PBS sobre hielo y a continuación se añadió un volumen adecuado de tampón de lisis, tras lo cual las células se separaban de la placa con un rascador y se pasaba el volumen obtenido a un tubo Eppendorf. Para obtener proteínas a partir de tejidos, estos se disgregaron en tampón de lisis usando un politrón (IKA-Werke) o con un homogenizador Precellyn 24 (Bertin Technologies). El tampón de lisis utilizado fue el tampón RIPA (NP-40 1%; deoxicolato sódico 1%; SDS 0,1%; NaCl 150 mM; tampón fosfato 10 mM, pH=7,2). Dicho tampón se suplementó con PMSF 1 mM; Na₃VO₄ 1 mM; NaF 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina y pepstatina). Posteriormente, tanto en el caso de las células en cultivo como en el caso de los tejidos, se dejaron reposar las muestras 15 minutos en hielo y se sometieron a sonicación a máxima potencia durante 5 minutos para romper el ADN de la muestra. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bio-Rad) y posteriormente se congelaron las muestras a -80°C hasta el

momento de correr el gel. Para correr dichos geles, se mezclaron cantidades iguales de proteína en cada caso con el tampón de carga Laemmli, se hirvieron durante 5 minutos a 96°C y se resolvieron en geles NuPage 4-12% (Invitrogen). Posteriormente se transfirieron a membranas Hybond-ECL (Amersham), dichas membranas se pre-hibridaron 1 hora a temperatura ambiente con 5% de leche en polvo en tampón TBS con 0,05% de BSA, y se incubaron durante la noche con cada anticuerpo primario, siguiendo las instrucciones de los proveedores. A la mañana siguiente, las membranas se lavaron varias veces con el tampón TBS con 0,05% de BSA y se incubaron a continuación con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados a HRP (Dako) o conjugados con Alexa Fluor 680® (Invitrogen). La detección en el caso de los anticuerpos conjugados a HRP se realizó por quimioluminiscencia utilizando ECL (Amersham) y revelando la señal con películas Hyperfilm™ (Amersham). En el caso de los anticuerpos conjugados con Alexa Fluor 680®, la detección se realizó utilizando el sistema LI-COR® Odyssey®. Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo son los siguientes: Sirt1 en muestras de ratón (ab12193, Abcam), Sirt1 en células humanas (2493, Cell Signaling), Actina (AC-15, Sigma), Histona 3 (ab1791, Abcam), Ac(K310)-p65 (ab19870, Abcam), p65 (sc-8008, Santa Cruz), p(S473)-AKT (4058, Cell Signaling), p(S308)-AKT (4056, Cell Signaling), AKT (07-416, Upstate), Pten (9552 y 9559, Cell Signaling).

III.4. qRT-PCR

El ARN total se obtuvo usando Trizol (Gibco) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para la retrotranscripción a ADNc, se utilizaron indistintamente uno de estos métodos :

- a) 2 µg de ARN diluido en 10 µL de tampón de transcripción reversa First-strand (Invitrogen) se trató con 1 µL ADNasa RQ (Promega) durante 30 minutos a 37°C y en presencia de 1 µL de RNase OUT (Invitrogen). Tras inactivar la ADNasa durante 15 minutos a 70°C, la muestra se enfrió en hielo, y se añadieron 100 pmol de una mezcla de hexámeros aleatorios de desoxirribonucleótidos (N₆), 3 mM de una mezcla de desoxirribonucleótidos, DTT al 1,5% (v/v) y se llevó todo hasta un volumen de 20 µL en el tampón de transcripción reversa First-strand (Invitrogen). A continuación, se incubaron las muestras a 68°C durante 5 minutos y se enfriaron en hielo 2 minutos, tras lo cual se añadió 1 µL de

RNase OUT (Invitrogen) y 1 μ L de transcriptasa reversa SuperScript™ II (Invitrogen). Tras una incubación de 90 minutos a 42°C, se inactivó la transcriptasa reversa a 94°C durante 5 minutos y se congelaron las muestras a -20°C hasta su utilización.

- b) 2 μ g de ARN se diluyeron hasta 29 μ L en agua tratada con DEPC, se añadieron 100 pmol de una mezcla de hexámeros aleatorios de desoxirribonucleótidos (N_6) y esto se pasó a tubos Ready-To-Go (Amersham) en los que se hizo la transcripción reversa tras incubación a 37°C durante 1 hora. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su utilización.

Una vez obtenidos los ADNc, se diluyeron apropiadamente según la expresión de cada gen a investigar (en general, dilución 1:100 en agua destilada), y se mezclaron 5 μ L del ADNc diluido con 9 μ L de SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) y con 1 μ L de una disolución 20 μ g/ μ L de los oligonucleótidos correspondientes en cada caso. Esta mezcla se analizó en un termociclador 7500Fast (Applied Biosystems) con los siguientes pasos: un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos seguido de 40 ciclos de amplificación (15 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de anillamiento a 60°C, 1 minuto de extensión a 68°C), seguido por un paso de disociación del producto final. La cantidad de producto obtenido en cada muestra se relativizó siempre a la cantidad de producto de un gen de mantenimiento celular (*housekeeping genes*; se utilizaron como controles indistintamente los genes de β -actina o de L32) en dicha muestra.

Los oligonucleótidos utilizados en cada caso para ratón fueron:

Sirt1-F	5'- GACGATGACAGAACGTCACAC-3'
Sirt1-R	5'- CGAGGATCGGTGCCAATCA-3'
Sirt1-Fbis	5'-CCCTTCTCAGTCTGCTCCAC-3'
Sirt1-Rbis	5'-CTCCACGAACAGCTTCACAA-3'
Actin-F	5'-GGCACCACACCTTCTACAATG-3'
Actin-R	5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'
p16 ^{Ink4A} -F	5'-CGTACCCCGATTTCAGGTGAT-3'
p16 ^{Ink4A} -R	5'-TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT-3'
TNF-F	5'-CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'
TNF-R	5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
IL6-F	5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'
IL6-R	5'-TCCACGATTTCCCAGAGAAC-3'
Emr1-F	5'-TGACTCACCTTGTGGTCCTAA-3'
Emr1-R	5'-CTTCCCAGAATCCAGTCTTTCC-3'
CD68-F	5'-TGTCTGATCTTGCTAGGACCG-3'
CD68-R	5'-GAGAGTAACGGCCTTTTTGTGA-3'

CYP2E1-F	5'-CGTTGCCTTGCTTGTCTGGA-3'
CYP2E1-R	5'-AAGAAAGGAATTGGGAAAGGTCC-3'
L32-F	5'-GCCAGGAGACGACAAAAAT-3'
L32-R	5'-AATCCTCTTGCCCTGATCC-3'
UCP1-F	5'-GGGCCCTTGTAACAACAAA-3'
UCP1-R	5'-GTCGGTCCTTCCTTGGTGTA-3'
UCP3-F	5'-GTCTGCCTCATCAGGGTGTT-3'
UCP3-R	5'-CCTGGTCCTTACCATGCAGT-3'
CoxII-F	5'-ACGAAATCAACAACCCCGTA-3'
CoxII-R	5'-GGCAGAACGACTCGGTTATC-3'
CoxIV-F	5'-AGATGAACCATCGCTCCAAC-3'
CoxIV-R	5'-ATGGGGTTGCTCTTCATGTC-3'
CitC-F	5'-CCAAATCTCCACGGTCTGTT-3'
CitC-R	5'-GTCTGCCCTTTCTCCCTTCT-3'
ATP Sintasa-F	5'-GAGGGATTACCACCCATCCT-3'
ATP Sintasa-R	5'-CATGATTCTGCCCAAGGTCT-3'
SREBP1c-F	5'-TAGAGCATATCCCCCAGGTG-3'
SREBP1c-R	5'-GGTACGGGCCACAAGAAGTA-3'
Nrf1-F	5'-CAACAGGGAAGAAACGGA-3'
Nrf1-R	5'-GCACCACATTCTCCAAAGGT-3'
MnSOD-F	5'-CCGAGGAGAAGTACCACGAG-3'
MnSOD-R	5'-GCTTGATAGCCTCCAGCAAC-3'

Los oligonucleótidos utilizados en cada caso para humano fueron:

PHLPP-1FH	5'-ACTGGGATTTGGGGAGCTG-3'
PHLPP-1RH	5'-CGTCTTGTCCATCGGTTCACT-3'
PDPK1-1FH	5'-TGTAACCAGAGAGCGGGATGT-3'
PDPK1-1RH	5'-TTTTGGCATAACTAAGGCCGAA-3'
PDPK1isB-FH	5'-GAAGGCTCTTTTCCACGGTT-3'
PDPK1isB-RH	5'-GGCCCTGGTCGCATATTCTC-3'
Ku70-1FH	5'-AGTCATATTACAAAACCGAGGGC-3'
Ku70-1RH	5'-CCTTGGAGGCATCAACCAAAAA-3'
actin-FH	5'-CAAGGCCAACCGCGAGAAGAT-3'
actin-RH	5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAGCAC-3'

IV. Tumores humanos

IV. Origen, obtención y procesamiento de tumores de tiroides humanos

Muestras de 49 tumores de tiroides (foliculares, papilares u oncocíticos) junto con las correspondientes muestras de tejido normal fueron obtenidas por el Dr. Xavier Matias-Guiu (Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Universidad de Lleida) y se analizaron en colaboración la Dra. Mercedes Robledo y el mencionado Dr. Matias-Guiu en un TMA para la expresión por inmunohistoquímica de Sirt1 con el anticuerpo anti-Sirt1 (S5196, Sigma) . El procesamiento de las muestras de TMA para IHQ es igual al que se describe en la sección de II.6 de Materiales y Métodos.

Resultados

I. Generación y caracterización de los ratones Sirt1-tg

I.1. Generación de los ratones Sirt1-tg

Con el fin de avanzar en la comprensión de los efectos de Sirt1 sobre el metabolismo, el envejecimiento y el cáncer en mamíferos, nos propusimos obtener ratones transgénicos para este gen. Para ello, obtuvimos 2 clones diferentes de una librería de BACs (RP23-119G23 ó tgA y RP24-306L15 ó tgB), que contenían ambos la secuencia genómica de Sirt1. Los BACs tienen la ventaja de ser grandes segmentos de genoma por lo que, además del gen de interés, contienen la mayor parte o todos los elementos reguladores de dicho gen, de forma que la regulación es muy similar o idéntica a la de las copias endógenas (Giraldo and Montoliu, 2001), siendo el aumento de expresión conseguido un aumento moderado, sistémico y homogéneo, constituyendo así un modelo de intervención farmacológica dirigida selectivamente a aumentar los niveles de la proteína de interés, en nuestro caso Sirt1. Por el contrario, pueden presentar la desventaja de llevar algún otro gen adicional, debido a su gran longitud. En nuestro caso, fue imposible encontrar BACs que contuvieran la secuencia de Sirt1 sin presentar genes adicionales, de modo que elegimos 2 BACs distintos pero que contenían genes adicionales diferentes entre sí (**Figura 8a**). Así, cuando observásemos efectos reproducibles entre ambas líneas, podríamos tener una elevada certeza de que dichos efectos se deberían a la sobreexpresión de Sirt1, y no a la de los genes acompañantes. Primeramente, confirmamos que las secuencias terminales de ambos insertos correspondían a las publicadas en la base de datos de NCBI, por secuenciación a partir de los elementos flanqueantes T7 y SP6. Una vez hecha esta comprobación, los BACs se linearizaron utilizando la enzima de corte único P1-SceI, y posteriormente fueron inyectados en oocitos fertilizados provenientes de cruces entre ratones CBA x C57BL/6 e implantados en hembras pseudogestantes. De las camadas resultantes, analizamos la presencia de los transgenes por PCR, obteniendo 5 animales positivos de 33 crías para el tgA, y 3 animales positivos de 18 crías para el tgB (**Figura 8b**). A continuación, intentamos generar líneas de ratones a partir de todos los positivos, aunque sólo lo conseguimos en un caso para cada transgén (a partir del fundador A4 generamos la línea tgA, y a partir del fundador B1 generamos la línea tgB). Conviene ahora mencionar que la línea tgB se consiguió más tarde en el tiempo que la línea tgA, motivo por el cual parte de los experimentos que se presentan en esta tesis están hechos sólo en la línea tgA. Aun así, los ensayos más importantes se

han reproducido todos en la línea tgB también. Una vez conseguidas las líneas, determinamos el número de copias integradas en el genoma por Southern Blot con una sonda específica para Sirt1, y relativizando la señal frente a la obtenida con una sonda para otro gen control, en este caso IGF-1. De esta forma, llegamos a la conclusión de que la línea tgA presentaba una única copia adicional, mientras que la tgB presentaba cuatro copias extra (**Figura 8c**). A continuación, intentamos determinar también por Southern Blot el número de inserciones de los transgenes con sondas dirigidas específicamente contra las secuencias del genoma adyacentes a las secuencias genómicas contenidas en los transgenes. Dicho número puede no coincidir con el número de copias, ya que con gran frecuencia pueden ocurrir inserciones en tándem en el mismo sitio de inserción. En el caso del tgA, confirmamos un único sitio de inserción (**Figura 8d**), concordante con el resultado anterior de una única copia extra, pero en el caso del tgB no pudimos llegar a determinar inequívocamente el número de inserciones, pues las zonas genómicas adyacentes a la secuencia de dicho transgén, eran secuencias de varias kilobases de ADN altamente repetitivo en el genoma de ratón, lo que hizo inviable obtener una sonda que diera un resultado claro, pero el hecho de que se transmita de forma mendeliana sugiere que, con alta probabilidad, se trata de un único sitio de inserción con cuatro copias.

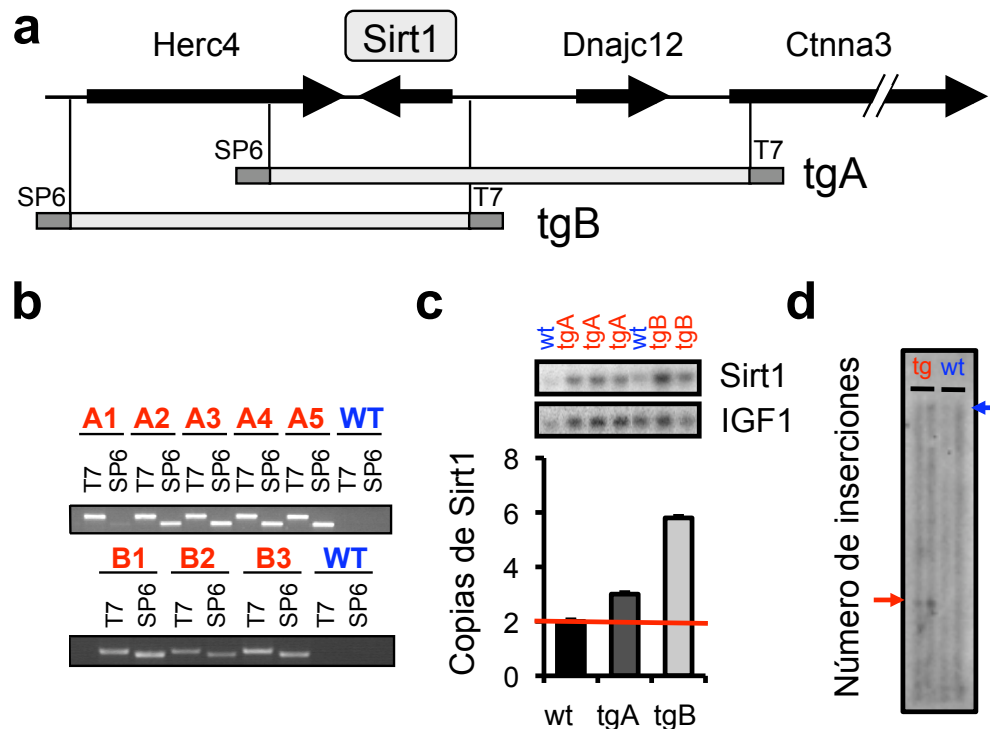


Figura 8. Generación de los ratones Sirt1-tg. (a) Esquema de los BACs utilizados en la microinyección. (b) Ratones positivos para el transgén tras la microinyección usando PCRs específicas para los extremos SP6 y T7. (c) Número de inserciones de Sirt1 medido por Southern Blot relativizando la señal de una sonda específica para Sirt1 frente a una sonda específica para IGF1 como gen control. Se utilizó EcoRI como enzima de restricción. (d) Southern Blot para determinar el número de inserciones en la línea tgA. La flecha azul indica las bandas generadas a partir de las copias endógenas, y la flecha roja indica la banda generada por el transgén insertado. Se utilizó PstI como enzima de restricción.

I.2. Caracterización de los niveles de expresión y funcionalidad de los transgenes de Sirt1

Una vez confirmada la integración de los transgenes, quisimos confirmar la sobreexpresión de Sirt1, tanto a nivel de ARN como a nivel de proteína. Para ello, utilizamos primero fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), obtenidos a partir de ambas líneas. En dichos MEFs pudimos comprobar la sobreexpresión de Sirt1 tanto a nivel de ARN por Northern Blot (**Figura 9a**), como a nivel de proteína por Western Blot (**Figura 9b**).

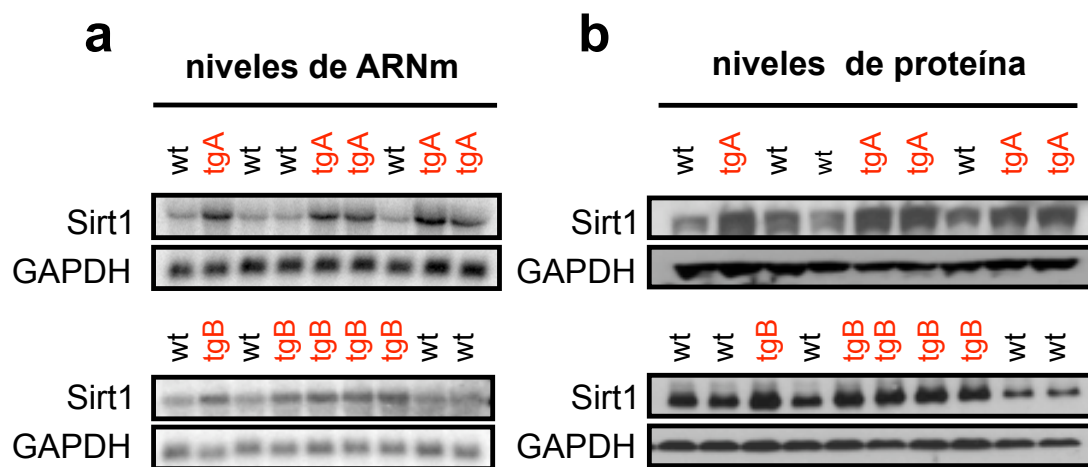


Figura 9. Niveles de expresión de Sirt1 en MEFs. (a) Niveles de expresión de ARNm de Sirt1 en MEFs por Northern Blot. (b) Niveles de expresión de proteína de Sirt1 en MEFs por Western Blot.

El siguiente paso fue comprobar la sobreexpresión de Sirt1 en tejidos. En todos los tejidos investigados, observamos una sobreexpresión homogénea por qRT-PCR de cerca de 3 veces respecto a los valores en los animales wild-type (**Figura 10a**). Consecuentemente, pudimos observar una sobreexpresión similar a nivel de proteína por Western Blot (**Figura 10b**) e inmunohistoquímica (IHQ; **Figura 10c**).

El mayor nivel de expresión *per se* no implica necesariamente que la proteína sobreexpresada sea funcional, así pues, quisimos comprobar la funcionalidad de nuestros transgenes de dos formas distintas. Primero, intentamos rescatar con nuestros transgenes el fenotipo observado en los ratones *knock-out* (KO) para Sirt1, que consiste en letalidad embrionaria elevada, microftalmia así como un peso reducido de los ratones (Cheng *et al.*, 2003). Para ello, cruzamos nuestros ratones

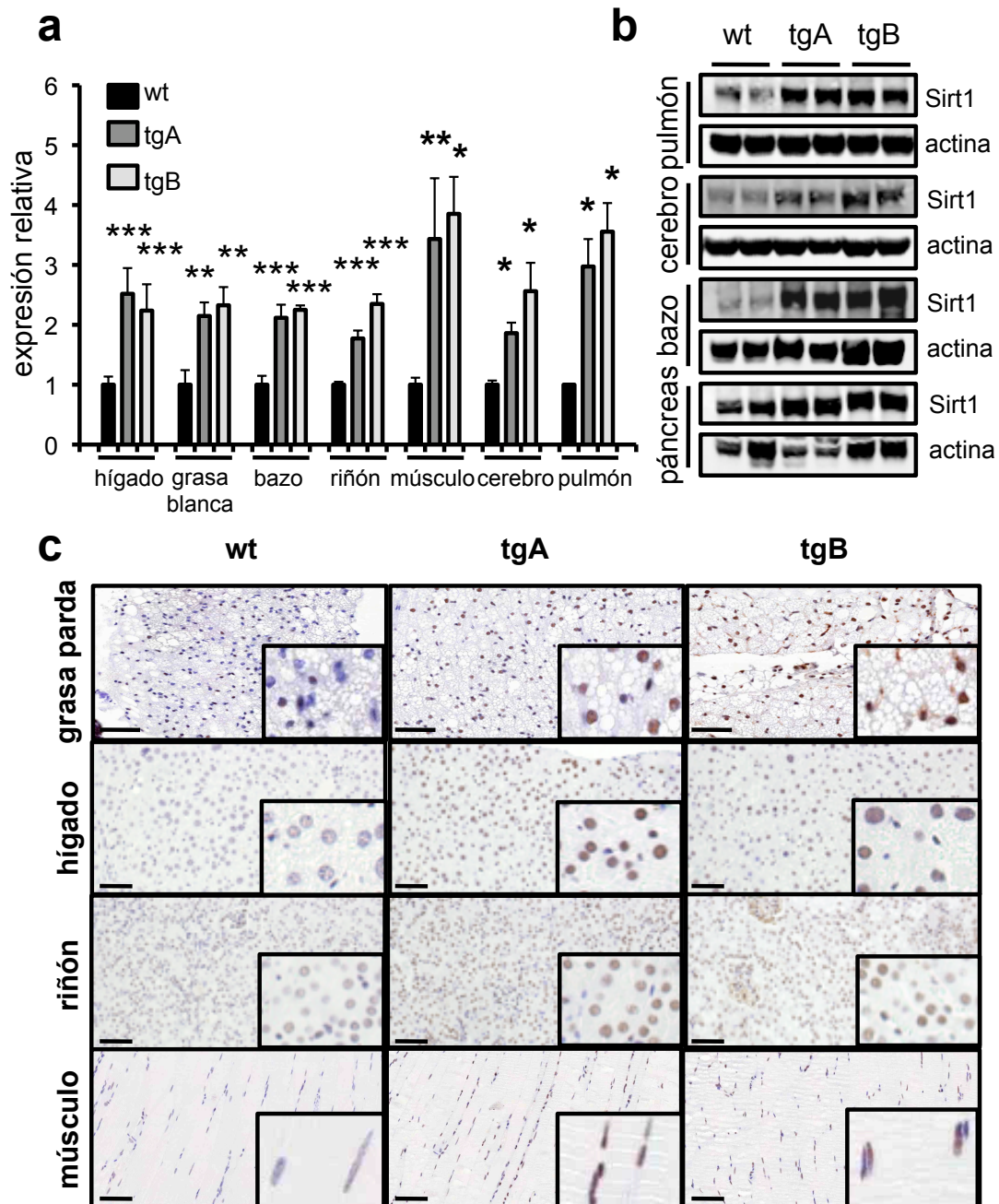
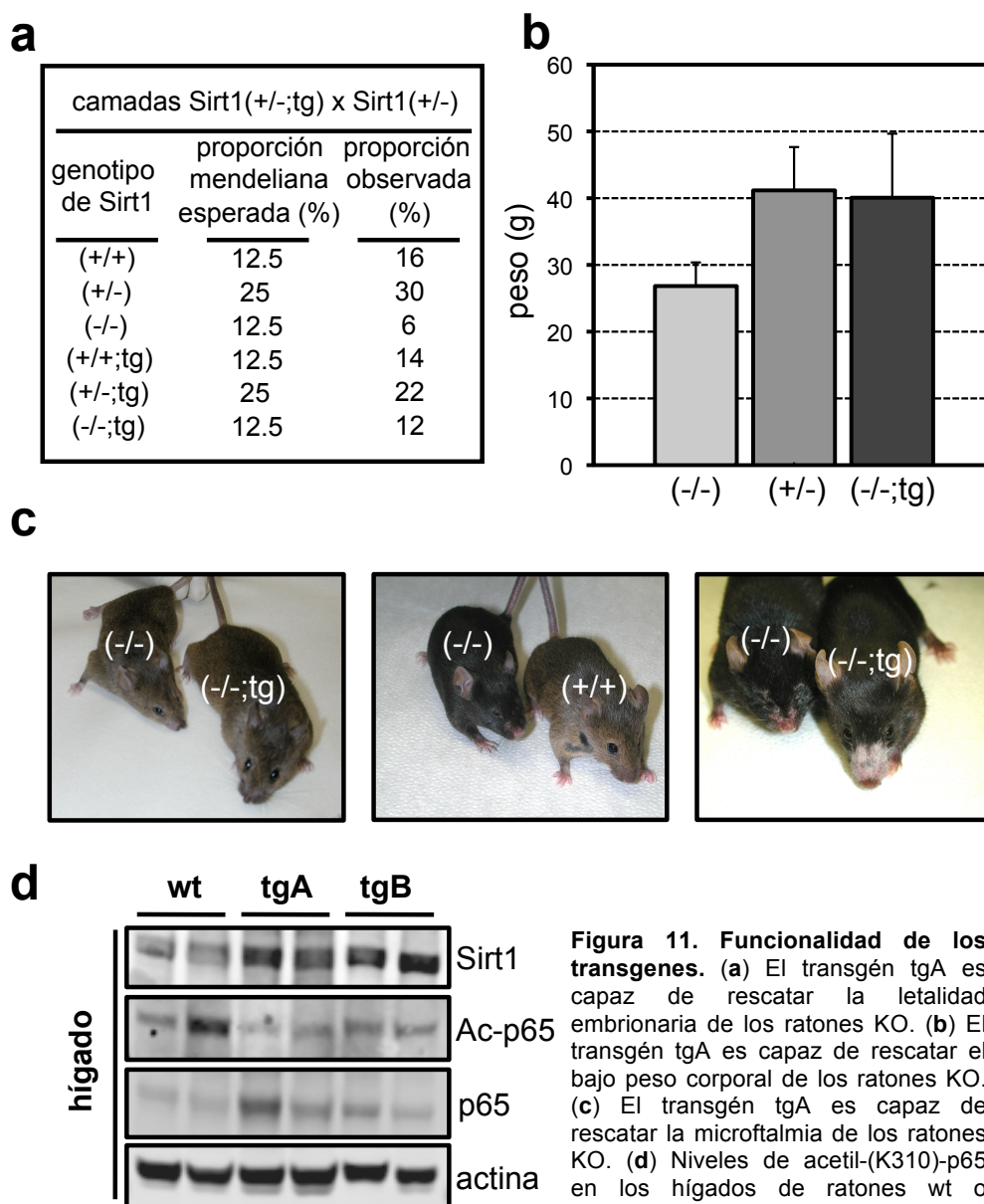


Figura 10. Niveles de expresión de Sirt1 en tejidos. (a) Niveles de expresión de ARNm de Sirt1 en tejidos por qRT-PCR; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$ según el test de la t de Student. (b) Niveles de expresión de proteína de Sirt1 en tejidos por Western Blot. (c) Niveles de expresión de proteína de Sirt1 en tejidos por IHQ. Las barras indican 100 μm en todos los casos menos en la grasa parda, en la que indican 50 μm .

transgénicos con los ratones heterocigotos para Sirt1 (proporcionados amablemente por el Dr. FW Alt), con el fin de obtener ratones *knock-out* (KO) para las copias endógenas de Sirt1 pero que presentasen simultáneamente el transgén de Sirt1. Así, pudimos comprobar que el tgA era capaz de rescatar los tres fenotipos mencionados anteriormente, pues los ratones Sirt1 (-/-/tg/.) nacían según la proporción mendeliana esperada y no presentaban un peso corporal reducido ni

tampoco defectos oculares (**Figuras 11a, 11b y 11c**). Adicionalmente, otra forma de comprobar la funcionalidad de la proteína Sirt1 sobreexpresada es observar una mayor deacetilación respecto a los niveles en los animales wild-type de alguna de sus dianas descritas. En nuestro caso, y por motivos que se ampliarán más adelante en esta tesis, nos decantamos por determinar los niveles de Ac(K310)-p65, una diana de Sirt1 previamente descrita (Yeung *et al.*, 2004), y pudimos observar que los hígados de ambas líneas transgénicas, presentaban menor acetilación respecto a los hígados de animales wild-type (**Figura 11d**), confirmando así la funcionalidad de ambos transgenes. Por otra parte, el hecho de que la expresión en ambas líneas sea similar aún cuando el tgB presenta más copias por Southern Blot puede ser indicativo de que parte de esas copias extra correspondan en realidad a fragmentos incompletos del BAC, de forma que no se traduzca en mayor expresión.



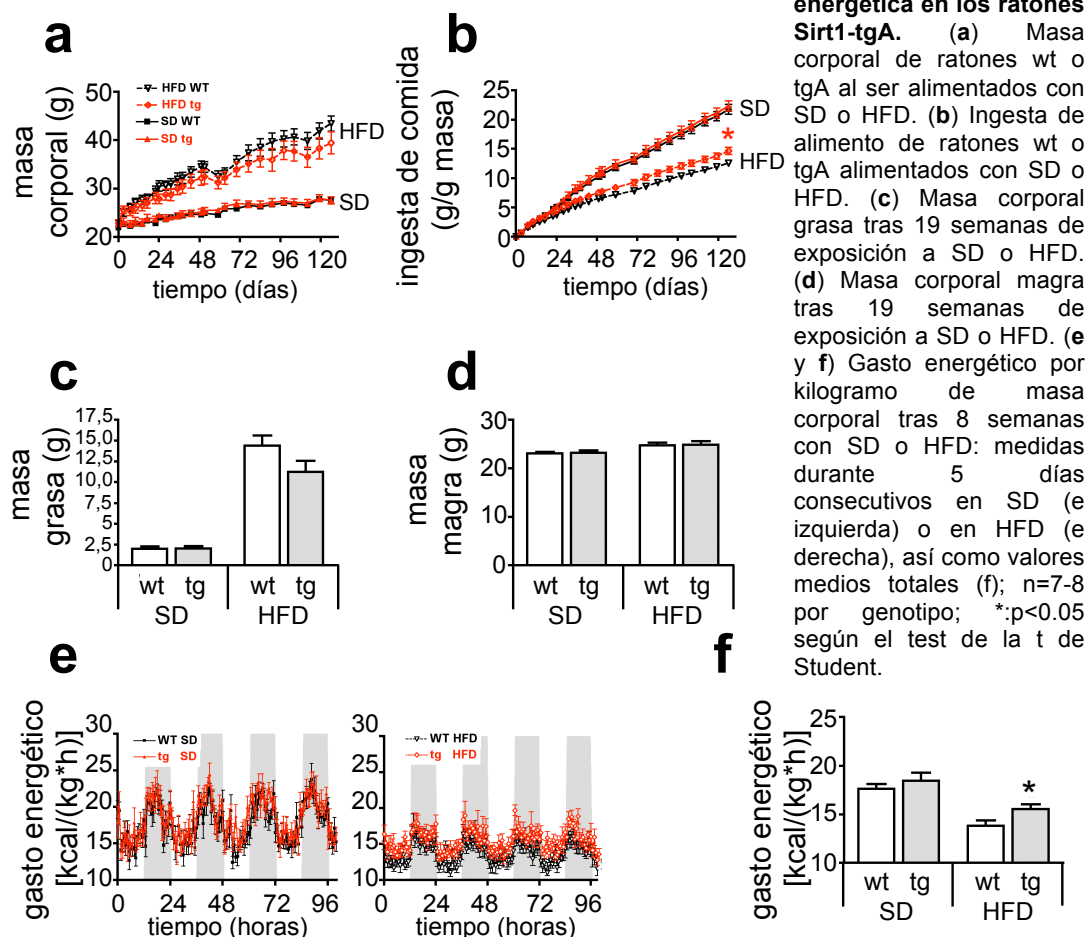
II. Análisis del efecto de Sirt1 sobre el metabolismo

Animados por artículos previos que implicaban a Sirt1 en la liberación de la insulina (Bordone *et al.*, 2006; Moynihan *et al.*, 2005), así como en otros trabajos en los que se ligaba a Sirt1 con la regulación del metabolismo energético (Picard *et al.*, 2004; Rodgers *et al.*, 2005), decidimos explorar el papel de Sirt1 en el metabolismo basal, así como en la respuesta del organismo a una dieta rica en grasas (HFD). Para ello, establecimos una colaboración con el laboratorio de Matthias H. Tschöp, de la Universidad de Cincinnati, que dio lugar a muchos de los resultados detallados a continuación y que cristalizó en la publicación del artículo Pfluger*, Herranz* *et al.*, 2008, que se incluye en el Anexo (hay que resaltar que en dicha colaboración exploramos únicamente la línea tgA debido al retraso en la generación de la línea tgB, sin embargo, más adelante en el presente trabajo confirmamos los principales fenotipos también en la línea tgB, como se puede observar en las **Figuras 16d y 18**).

II.1. Exploración del efecto de Sirt1 sobre el metabolismo basal y la homeostasis energética

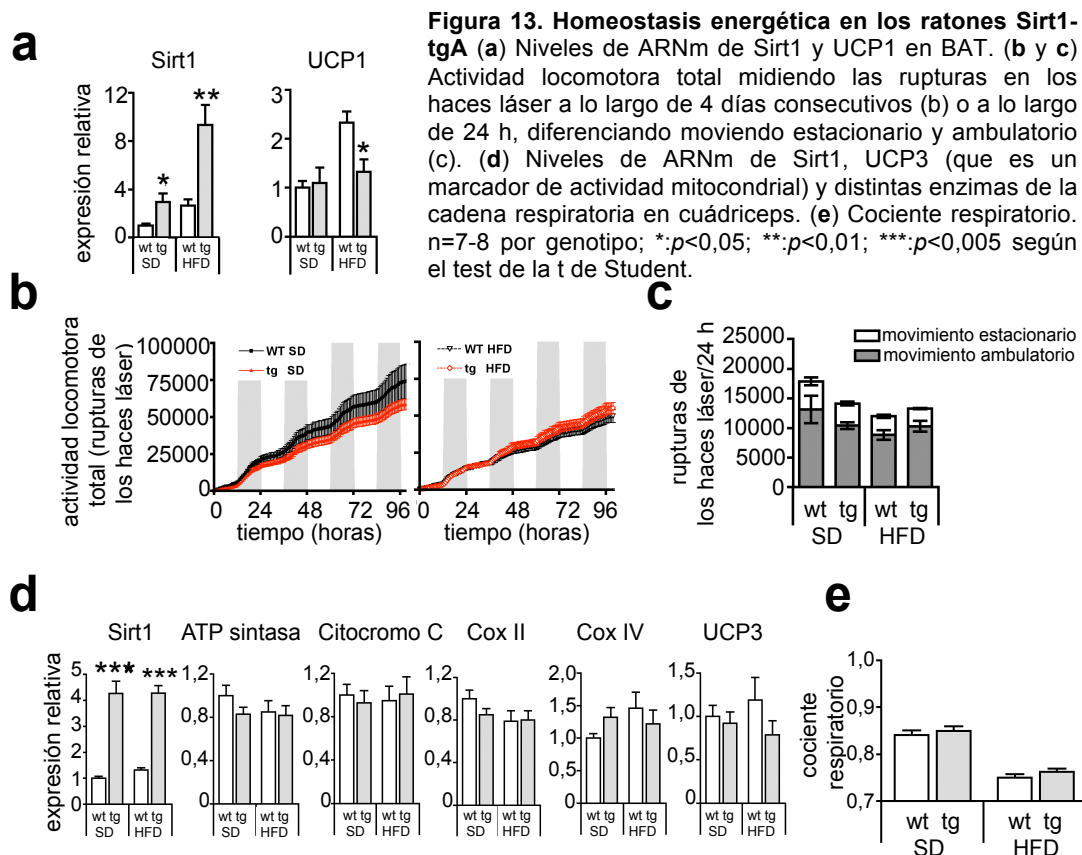
Se había descrito previamente que el déficit de Sirt1 provocaba una reducción en el peso corporal de los ratones (Cheng *et al.*, 2003) y, además, dicha deficiencia impedía el aumento en la actividad locomotora que se produce cuando se somete a los ratones a restricción calórica (CR) (Chen *et al.*, 2005). Debido a esto, comenzamos este estudio explorando el efecto de la sobreexpresión de Sirt1 en el peso corporal, la ingesta de alimento y el balance energético. Para ello, tratamos ratones de 8-10 semanas de edad con dieta estándar (SD) o con dieta rica en grasas (HFD), durante un periodo de 5 meses consecutivos. Así, observamos que los ratones tgA presentaban un peso equiparable al de los ratones wt, cuando se alimentaban tanto con SD como con HFD (**Figura 12a**). Consecuentemente, tampoco observamos diferencias en cuanto al total de masa corporal grasa o de masa corporal magra (**Figuras 12c y 12d**), aunque sí se pudo apreciar una ligera tendencia (estadísticamente no significativa) hacia un menor peso y cantidad de grasa en los ratones tgA cuando se alimentaban con HFD (**Figuras 12a y 12c**). En cuanto a la ingesta de comida, de nuevo fue indistinguible entre los 2 genotipos cuando se alimentaron con SD, sin embargo, los ratones tgA mostraron una mayor

ingesta respecto a los wt cuando se alimentaron con HFD (**Figura 12b**). Por ello, nos preguntamos si dicho aumento en la ingesta calórica se veía acompañado de un aumento concomitante en el gasto energético y, de acuerdo con esta hipótesis, los ratones tgA alimentados con HFD presentaban un mayor gasto energético que los wt, medido por calorimetría indirecta, mientras que no pudimos observar diferencias al usar SD (**Figuras 12e y 12f**).



Para intentar explicar este aumento en el gasto energético, exploramos primero si los ratones tgA presentaban mayor termogénesis, sin embargo, no pudimos observar mayores niveles de UCP1 por qRT-PCR en la grasa parda (BAT) de los animales transgénicos (**Figura 13a**), lo que sugiere que el aumento del gasto no es consecuencia de una mayor termogénesis en el BAT y, de forma similar, tampoco conseguimos observar ninguna diferencia en cuanto a la actividad locomotora (**Figuras 13b y 13c**), lo que sugería que presentaban una termogénesis inducida por la actividad muy similar entre los 2 genotipos. Además, el coste energético de la actividad muscular parecía ser equivalente también, puesto que la expresión de UCP3 y de otras enzimas de la cadena respiratoria era muy similar entre los

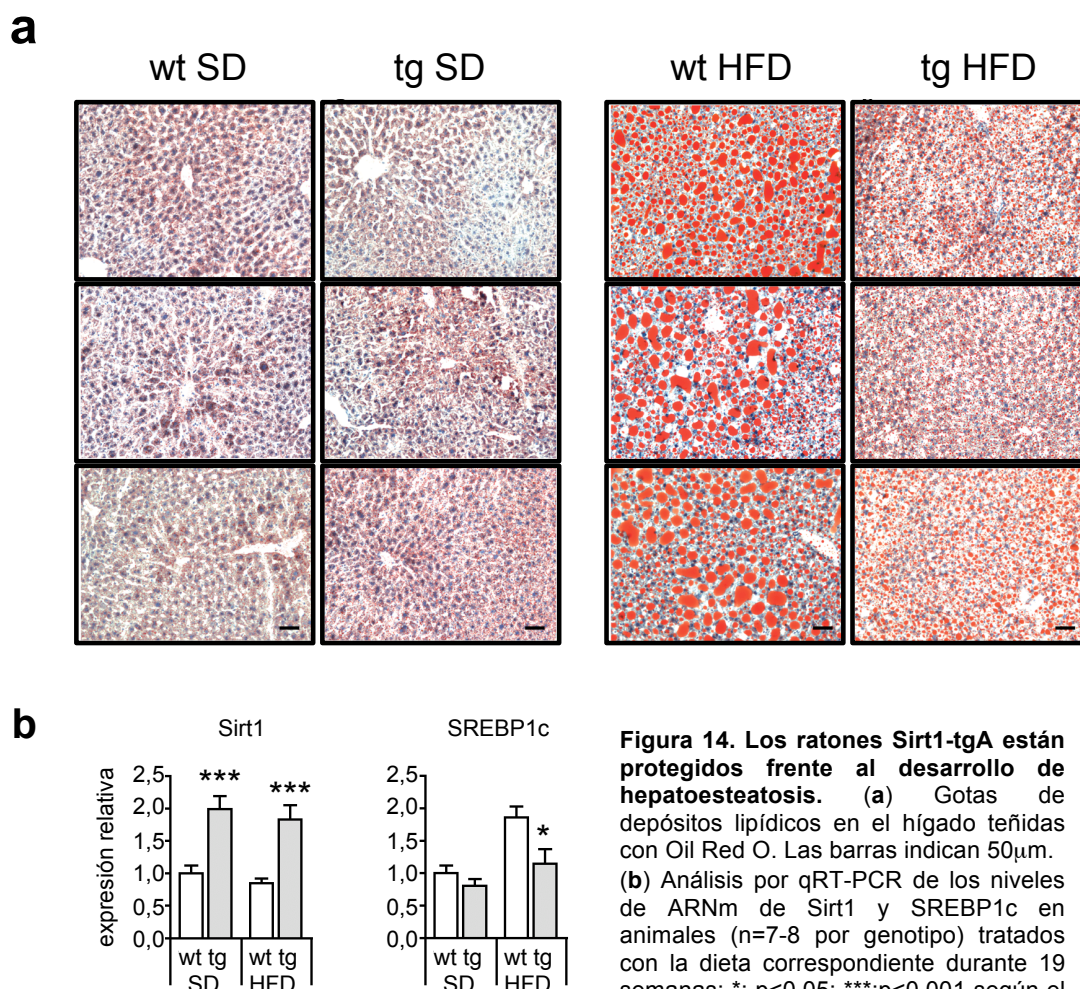
músculos de animales wt y animales tgA (**Figura 13d**). Más aún, los ratones tgA presentaban un cociente respiratorio indistinguible del de los ratones wt (**Figura 13e**), lo que sugería que el patrón de utilización de nutrientes para obtener energía era también muy similar entre ambas líneas. Así pues, aunque los ratones tgA presentan un moderado aumento en la ingesta de comida cuando se alimentan con HFD, éste se ve acompañado de forma paralela de un modesto aumento en el gasto energético que indica que los ratones tgA presentan una homeostasis energética equilibrada, sin embargo, no hemos sido capaces de averiguar con certeza cómo se produce este mayor gasto energético.



II.2. Sirt1 protege del desarrollo de esteatosis hepática asociado a HFD

Como se ha explicado anteriormente, Sirt1 se ha implicado en el control del metabolismo lipídico (Picard *et al.*, 2004), y se sabe que el tratamiento continuado con HFD provoca la acumulación de grasa en el hígado, que termina provocando el desarrollo de *hígado graso* o esteatosis, patología que puede acabar provocando esteatohepatitis no-alcohólica (Perlemuter *et al.*, 2007), y ésta a su vez puede derivar en cirrosis, que es uno de los factores de riesgo más importantes para el

desarrollo de cáncer de hígado (Powell *et al.*, 2005). Así pues, investigamos la acumulación de grasa en el hígado mediante tinción con Oil Red O. Como era de esperar, los ratones wt alimentados con SD presentaban muy pocas gotas de grasa, mientras que los tratados con HFD mostraban una esteatosis hepática severa. Por el contrario, los animales tgA tratados con HFD presentaban una drástica reducción en el número de gotas de grasa en el hígado, siendo las imágenes comparables a las obtenidas en los animales alimentados con SD (**Figura 14a**). Hay que resaltar en este momento que dicha protección también se ha visto reproducida en la línea tgB, como explicaremos más adelante (**Figura 18c**). De forma consistente con esta protección frente a la esteatosis con respecto a los ratones wt, los ratones tgA mostraban menores niveles de SREBP1c (**Figura 14b**), que es un factor de transcripción especialmente relevante en la formación de grasa, y que normalmente se ve aumentado en los procesos de esteatosis (Ahmed and Byrne, 2007).



II.3. Sirt1 protege de la intolerancia hepática frente a la glucosa inducida por la HFD

A continuación, investigamos la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en los distintos grupos de animales, ya que hay numerosos trabajos que muestran que la esteatosis puede ser una consecuencia directa de la resistencia periférica a la insulina (Medina *et al.*, 2004). Comenzamos analizando los valores de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres en sangre tras ayuno nocturno a las 8 semanas de comenzar los distintos tratamientos, pero no pudimos observar ninguna diferencia entre los distintos grupos de ratones. Repetimos dicha medida tras exposición crónica de 18 semanas a las distintas dietas, y pudimos corroborar el esperado aumento en los niveles de glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos, así como los valores de otros parámetros bioquímicos, sin embargo, no pudimos encontrar ninguna diferencia entre los distintos genotipos (**Tabla 2**). No obstante, quisimos estudiar en más detalle el impacto de la HFD en la tolerancia a la glucosa, así que sometimos a los animales a un test de tolerancia a la glucosa (GTT) y pudimos observar que, al confrontar a los animales con una inyección de glucosa intraperitoneal, los ratones tratados con HFD presentaban un mayor incremento en los niveles de glucosa en sangre respecto a los animales con SD, como era esperable, sin embargo, los ratones tgA tratados con HFD conseguían

	SD				HFD				
	wt		tg		wt		tg		
	media	SEM	media	SEM	media	SEM	media	SEM	unidades
Glucosa en ayuno a las 8 semanas	134	± 5,6	125	± 6,0	146	± 8,0	142	± 8,7	mg/dL
Glucosa en ayuno a las 18 semanas	115,6	± 3,8	112,0	± 4,0	125,9	± 9,4	135,0	± 7,6	mg/dL
Glucosa <i>ad libitum</i> a las 18 semanas	140,8	± 8,7	140,6	± 9,0	145,5	± 6,9	140,1	± 6,4	mg/dL
Insulina en ayuno a las 8 semanas	76,9	± 6,2	92,3	± 8,7	161,8	± 22	141,2	± 13,8	pg/mL
Insulina en ayuno a las 18 semanas	56,0	± 5,4	68,8	± 1,7	115,8	± 11	149,4	± 47,4	pg/mL
Colesterol en ayuno a las 8 semanas	58,8	± 1,3	61,7	± 3,8	88,1	± 6,0	85,4	± 5,8	mg/dL
Colesterol en ayuno a las 18 semanas	124,2	± 6,2	125,6	± 5,2	186,8	± 17	176,1	± 13,3	mg/dL
Triglicéridos en ayuno a las 8 semanas	59,7	± 4,0	66,7	± 3,8	97,6	± 9,5	80,9	± 10,6	mg/dL
Triglicéridos en ayuno a las 18 semanas	53,6	± 3,5	68,2	± 4,8*	73,7	± 5,8	74,3	± 6,7	mg/dL
Ácidos grasos libres <i>ad libitum</i> a las 18 semanas	0,141	± 0,03	0,152	± 0,04	0,115	± 0,03	0,132	± 0,03	mM
Ácidos grasos libres en ayuno a las 18 semanas	0,516	± 0,09	0,497	± 0,04	0,379	± 0,03	0,377	± 0,05	mM
Leptina <i>ad libitum</i> a las 20 semanas	5,44	± 0,77	5,42	± 1,12	68,2	± 0,1	49,4	± 11,1	ng/mL
Adiponectina <i>ad libitum</i> a las 20 semanas	4,70	± 0,13	4,61	± 0,22	5,35	± 0,3	5,24	± 0,34	µg/mL

Tabla 2. Análisis sanguíneos. Valores de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, leptina y adiponectina, según condición, genotipo y dieta. n=7-8 por grupo; *:p<0,05 según el test de la t de Student.

disminuir más rápidamente dichos niveles respecto a sus controles wt, de forma que el área bajo la curva (AUC) indicaba que los ratones tgA presentaban una tolerancia a la glucosa significativamente mejor que la de los animales wt (**Figura 15a**; conviene mencionar que dicha mejora en la tolerancia a la glucosa también se reprodujo con posterioridad en la línea tgB, como se explica en la **Figura 18b**).

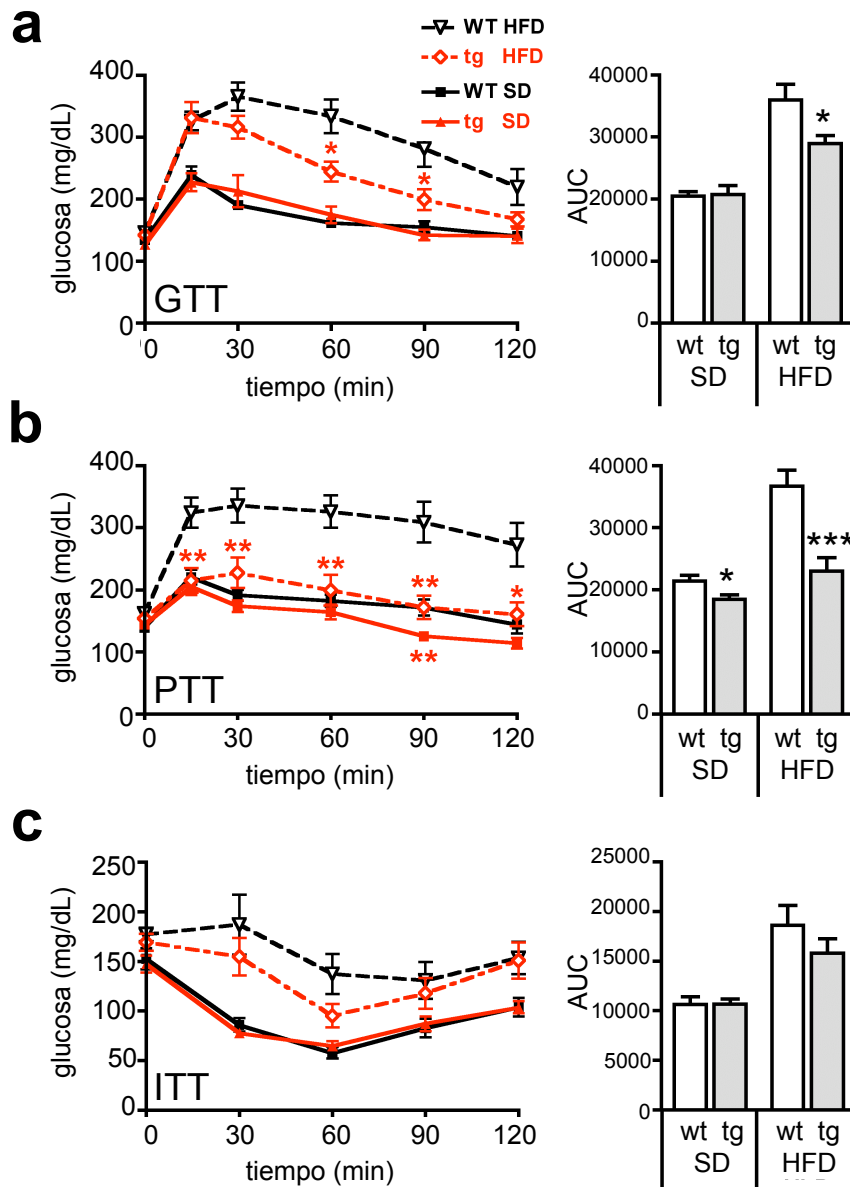


Figura 15. Los ratones Sirt1-tgA están protegidos de la intolerancia hepática a la glucosa promovida por HFD. (a) Test de tolerancia a la glucosa (GTT) en los distintos grupos tras 7 semanas de tratamiento con cada dieta. (b) Test de tolerancia al piruvato (PTT) en los distintos grupos tras 16 semanas de tratamiento con cada dieta. (c) Test de tolerancia a la insulina (ITT) en los distintos grupos tras 13 semanas de tratamiento con cada dieta. Las curvas de glucosa se muestran a la izquierda, y las áreas bajo la curva (AUC) a la derecha; n= 7-8 por grupo; la significancia estadística se determinó con el test de la t de Student; *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001.

Como habíamos observado con anterioridad la protección frente al depósito de grasa en los hígados de los animales tgA (**Figura 14a**), conjeturamos que estos

ratones presentarían un efecto beneficioso similar o aun mayor en el metabolismo hepático de la glucosa. Por este motivo, sometimos a los animales a un test de tolerancia al piruvato (PTT), ya que el piruvato es un precursor de la síntesis de la glucosa en la ruta de la gluconeogénesis, y este proceso se lleva a cabo de forma mayoritaria en el hígado. Así, inyectamos piruvato intraperitonealmente a los distintos grupos de ratones y seguidamente monitorizamos los niveles de glucosa en sangre, observando que los ratones wt tratados con HFD presentaban un rápido incremento en los niveles sanguíneos de glucosa, incremento que se mantuvo durante las 2 horas de estudio posterior. Por el contrario, los niveles de glucosa en animales tgA alimentados con HFD permanecieron mucho menores respecto a los controles wt y, de hecho, fueron comparables a los obtenidos en ratones con SD. Más aún, los niveles sanguíneos de glucosa en los animales tgA con SD fueron significativamente inferiores a los de los wt con SD (**Figura 15b**). Ambos resultados sugieren una menor resistencia hepática a la acción de la insulina en los ratones transgénicos.

En contraste a lo observado en el GTT y PTT, al someter a los animales a un test de tolerancia a la insulina (ITT) sólo pudimos observar una tendencia no significativa hacia unos menores niveles de glucosa en los ratones tgA con HFD (**Figura 15c**), indicando por tanto que Sirt1 no afecta significativamente a la resistencia periférica a la acción de la insulina en ratones jóvenes, lo que nos sugiere que el efecto protector a nivel hepático se ve probablemente diluido en este ensayo por la ausencia de tal protección en el resto de los tejidos.

En conjunto, estos resultados indican que la sobreexpresión de Sirt1 protege específicamente de la intolerancia hepática a la glucosa y de la resistencia hepática a la acción de la insulina.

II.4. Sirt1 protege de la inflamación hepática inducida por la HFD

A continuación, quisimos dilucidar el mecanismo por el cual Sirt1 ejerce estas funciones protectoras sobre el hígado. Se sabe por estudios previos que las dietas ricas en grasa y la obesidad asociada a la dieta provocan una reacción inflamatoria crónica, que se piensa que es crucial para el desarrollo de la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina (Hotamisligil, 2006), por lo que decidimos investigar si Sirt1 estaba disminuyendo la inflamación, lo que nos permitiría explicar los resultados obtenidos con anterioridad. De acuerdo con esta premisa, la

expresión de IL-6 y TNF- α , dos de las principales citoquinas pro-inflamatorias, se encontraban significativamente aumentadas en los hígados de animales wt con HFD respecto a los controles con SD, mientras que los ratones tgA, sin embargo, seguían presentando niveles menores de ambas citoquinas, comparables a los obtenidos en ratones de ambos genotipos tratados con SD (**Figura 16a**).

Ambas citoquinas están reguladas por el factor de transcripción NF κ B que, a su vez, se activa (entre otras causas) a través del receptor TLR4 gracias a los lípidos alimentarios en el suero (Shi *et al.*, 2006). Además, Sirt1 se ha descrito previamente que deacetila e inhibe a NF κ B (Yeung *et al.*, 2004), efecto que precisamente hemos observado ya con anterioridad en los ratones transgénicos para Sirt1 (**Figura 11d**).

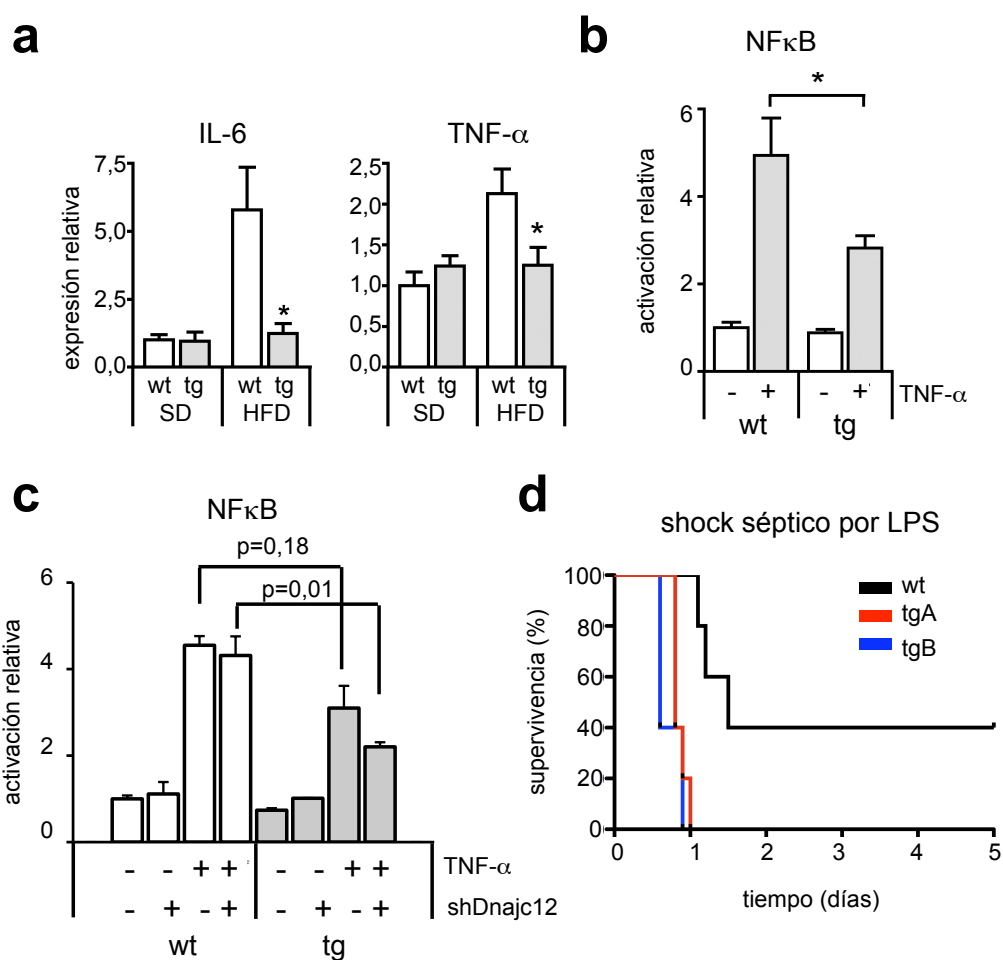


Figura 16. Los ratones Sirt1-tg están protegidos de la inflamación hepática. (a) Expresión de citoquinas inflamatorias por qRT-PCR en hígados de los distintos genotipos tras 19 semanas de tratamiento con SD o HFD; n=7-8 por genotipo. (b) Ensayo del gen reportero luciferasa en MEFs wt o tgA transfectados con el vector pNF κ BLuc, y tratados o sin tratar con TNF- α ; n=6-8 por genotipo. (c) Repetición del experimento mostrado en (b) en presencia o ausencia de un shRNA contra Dnajc12; n=2-4 por genotipo. (d) Supervivencia de los ratones wt, tgA o tgB frente al shock séptico inducido por LPS; n=5 por genotipo; *: $p<0,05$ según el test de la t de Student.

Por ello, decidimos investigar *in vitro* e *in vivo* si la actividad de NF κ B se encuentra disminuida en los ratones transgénicos, que previamente habíamos visto que podría estar afectada según el resultado obtenido en cuanto a los niveles de Ac(K310)-p65 en hígado (**Figura 11d**). Primero examinamos la activación de NF κ B *in vitro* en MEFs wild-type o transgénicos a través de un ensayo de gen reportero luciferasa bajo el control de elementos de respuesta a NF κ B y observamos que, tras estimular MEFs de los distintos genotipos con TNF- α , la activación de NF κ B en los MEFs tgA era significativamente menor que la de los MEFs wt (**Figura 16b**). Más aún, decidimos repetir dicho ensayo en presencia de un shRNA dirigido contra Dnajc12, el gen adicional presente en el transgén A (**Figura 8a**), para descartar que dicho efecto pudiera verse debido a la presencia de dicho gen, y obtuvimos un efecto similar (**Figura 16c**) al observado anteriormente en ausencia del shRNA, lo que nos llevó a concluir que dicho efecto se debía específicamente a la sobreexpresión de Sirt1. A continuación, realizamos un experimento *in vivo* de susceptibilidad al lipopolisacárido bacteriano (LPS), ya que el LPS es un agente inflamatorio que provoca respuestas mediadas en parte por TLR4 y NF κ B, y previamente se había demostrado que los animales con menor actividad de NF κ B son hipersensibles a la acción del LPS (Gadjeva *et al.*, 2004; Kisseleva *et al.*, 2006). De forma consistente con estos trabajos y con la menor actividad de NF κ B descrita anteriormente en los MEFs tgA, los ratones transgénicos para Sirt1 (tanto tgA como tgB) mostraron una marcada hipersensibilidad al shock séptico por LPS (**Figura 16d**).

Además de presentar menor actividad de NF κ B y menor expresión de citoquinas pro-inflamatorias, observamos también una mayor expresión de las proteínas antioxidantes MnSOD y Nrf1 en los hígados de los animales tgA (**Figura 17**), y ambas proteínas son genes diana de PGC1 α (St-Pierre *et al.*, 2006), que a su vez es activado por Sirt1 (Rodgers *et al.*, 2005).

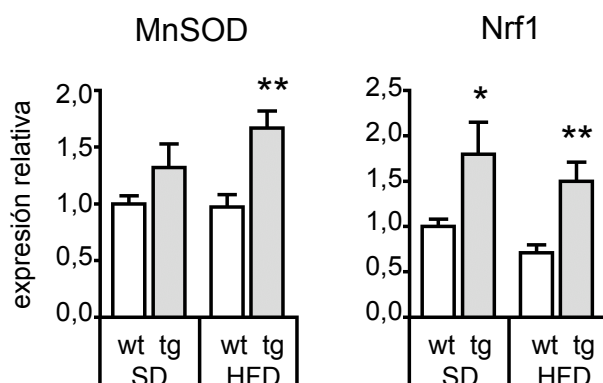


Figura 17. Los ratones Sirt1-tg muestran mayor expresión de proteínas antioxidantes en hígado. Expresión de las proteínas antioxidantes MnSOD y Nrf1 por qRT-PCR en hígado de los distintos genotipos tras 19 semanas de tratamiento con SD o HFD; n=7-8 por genotipo; la significancia estadística se determinó con el test de la t de Student; *:p<0,05; **:p<0,01

Adicionalmente, y más tarde en el tiempo, corroboramos en la línea tgB (**Figura 18**) los principales fenotipos descritos aquí para la línea tgA, y profundizamos aun más en la caracterización del efecto protector frente a la inflamación, de forma que ambas líneas presentaron menor infiltración de macrófagos y menores niveles de citoquinas pro-inflamatorias también en el tejido graso (WAT; **Figura 18a**). En resumen, la sobreexpresión de Sirt1 protege de la intolerancia hepática a la glucosa y de la esteatosis asociados al consumo de HFD y este efecto protector se puede explicar, al menos en parte, por la prevención frente a la activación de la ruta inflamatoria de NF κ B, así como por la activación de PGC1 α y de sus genes diana antioxidantes MnSOD y Nrf1.

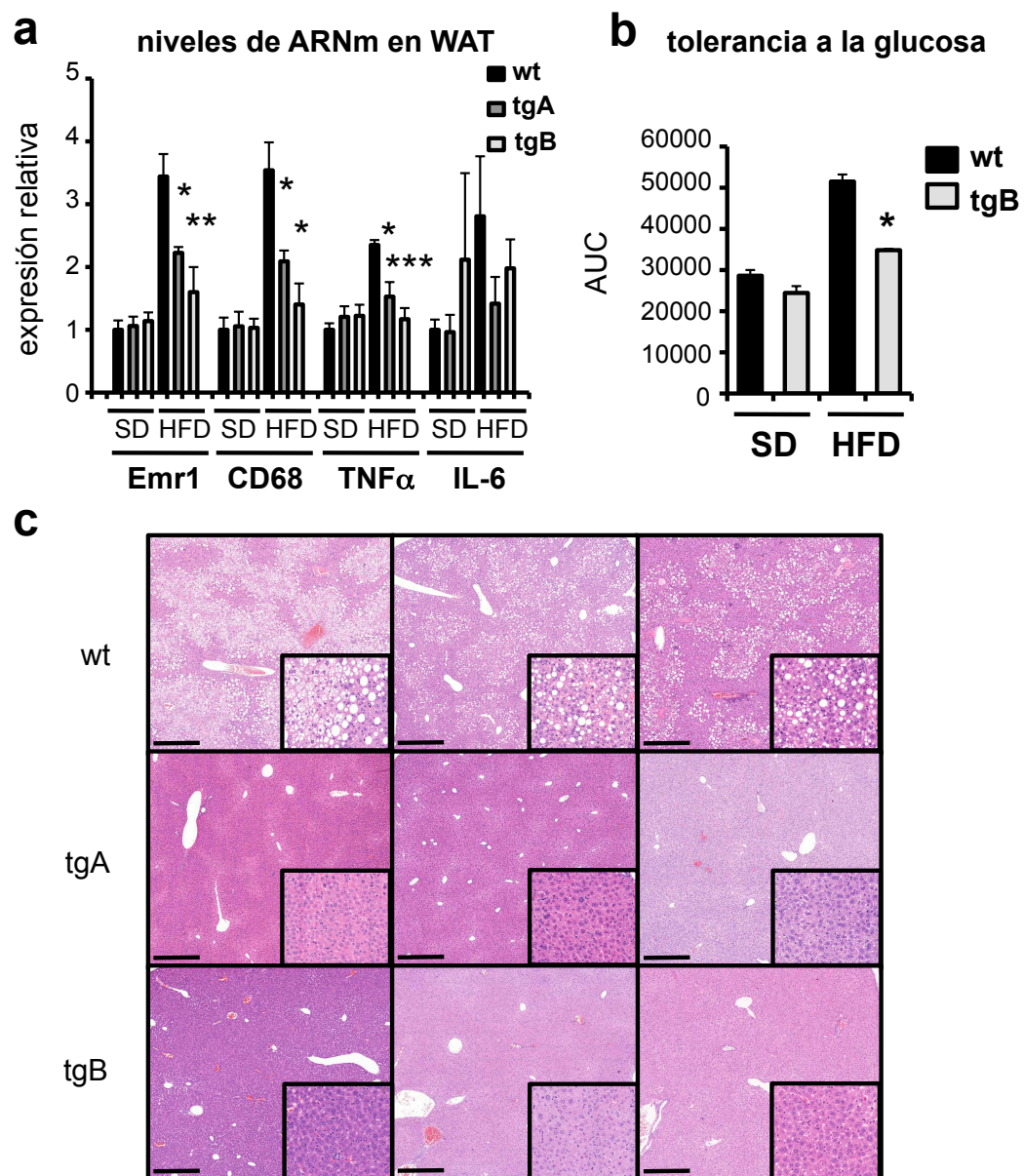


Figura 18. Los animales tgB recapitulan los efectos protectores frente a la HFD observados antes para tgA. (a) Infiltración de macrófagos (Emr1 y CD68) y citoquinas inflamatorias (TNF- α e IL-6) medidas por qRT-PCR en grasa blanca (WAT) en ratones mantenidos con SD o HFD durante 4 meses; $n \geq 3$ por grupo. (b) GTT en animales wt o tgB tratados con SD o HFD durante 1 mes; $n=5$ por grupo (c) Secciones de hígado teñidas con H/E de ratones tratados con SD o HFD durante 4 meses; $n=3$ por grupo; las barras indican 500 μ m. El análisis estadístico se hizo mediante el test de la t de Student; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,005$.

III. Análisis del efecto de Sirt1 sobre el envejecimiento

Como se ha explicado con anterioridad, la proteína Sirt1 se ha implicado extensamente en la longevidad de organismos modelo como *S. cerevisiae*, *C. elegans* o *D. melanogaster* (Kaeberlein *et al.*, 1999; Rogina and Helfand, 2004; Tissenbaum and Guarente, 2001), por lo que uno de los principales objetivos de la presente tesis era determinar el efecto de la sobreexpresión de Sirt1 en la longevidad del ratón así como su efecto en las enfermedades y marcadores asociados al envejecimiento. Conviene resaltar que el análisis de los efectos de Sirt1 sobre estos procesos, así como sobre el desarrollo de cáncer asociado a síndrome metabólico, dio lugar a la publicación del artículo Herranz *et al.*, 2010, que se incluye en el Anexo.

III.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la longevidad

Para determinar el impacto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la longevidad, estudiamos cohortes de ratones de ambas líneas transgénicas junto con sus correspondientes controles wt, de forma que todos los animales presentaban un fondo genético uniforme, aunque híbrido (C57BL6/CBA; 87,5%:12,5%). Sin embargo, y contrariamente a las observaciones realizadas previamente en otros

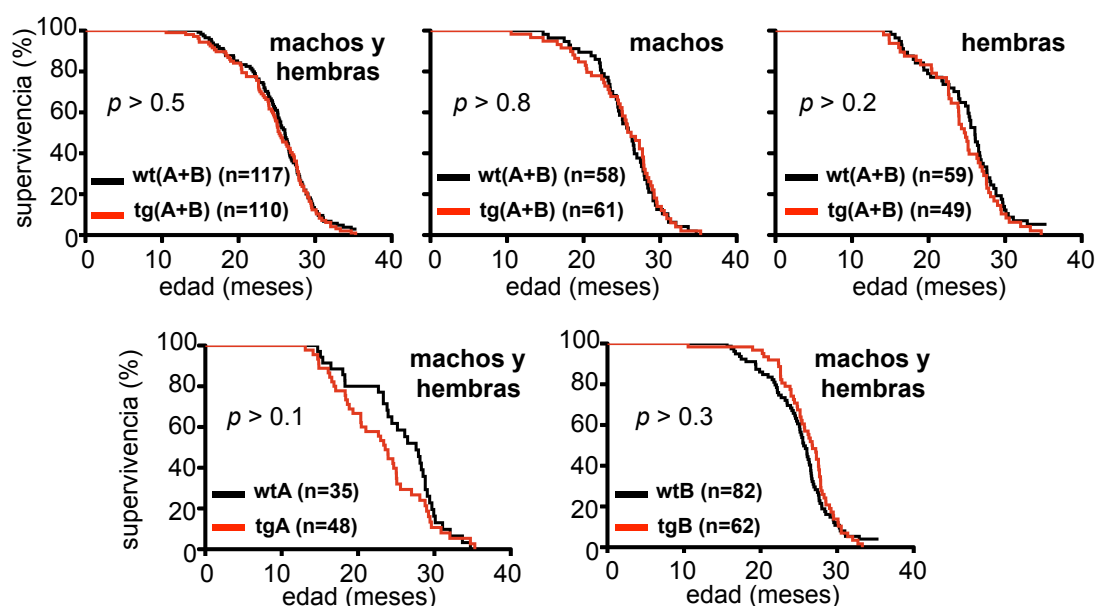


Figura 19. Efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la longevidad. Curvas de supervivencia de los distintos ratones wt, tgA o tgB. El análisis estadístico usando el Logrank test no permitió encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de ratones.

organismos, no pudimos observar ninguna diferencia significativa en la longevidad de los ratones transgénicos para Sirt1, ya fuera juntando ambas líneas para aumentar el número de ratones en estudio y así obtener mayor potencia estadística, o separando ambas líneas de ratones transgénicos con sus correspondientes controles wt (**Figura 19**). Tampoco observamos diferencia alguna al representar por separado las curvas de supervivencia de machos y hembras (**Figura 19**). Todo ello nos lleva a concluir que la sobreexpresión de Sirt1, al menos con los niveles conseguidos en nuestras líneas de ratones transgénicos, no tiene un impacto detectable en la longevidad murina.

III.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre enfermedades asociadas al envejecimiento

A pesar de no observar diferencias en la longevidad, quisimos hacer un análisis pormenorizado de los efectos de Sirt1 sobre la salud durante el proceso de envejecimiento y, para ello, determinamos su impacto en distintas enfermedades y marcadores que se ven comúnmente aumentados al envejecer.

III.2.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre el desarrollo espontáneo de tumores

Como el laboratorio de Manuel Serrano está especialmente interesado en los supresores tumorales y el cáncer, comenzamos realizando un estudio histopatológico detallado de los ratones de ambas colonias y nos centramos en la frecuencia de aparición de tumores malignos. Como se puede observar en la **Figura**

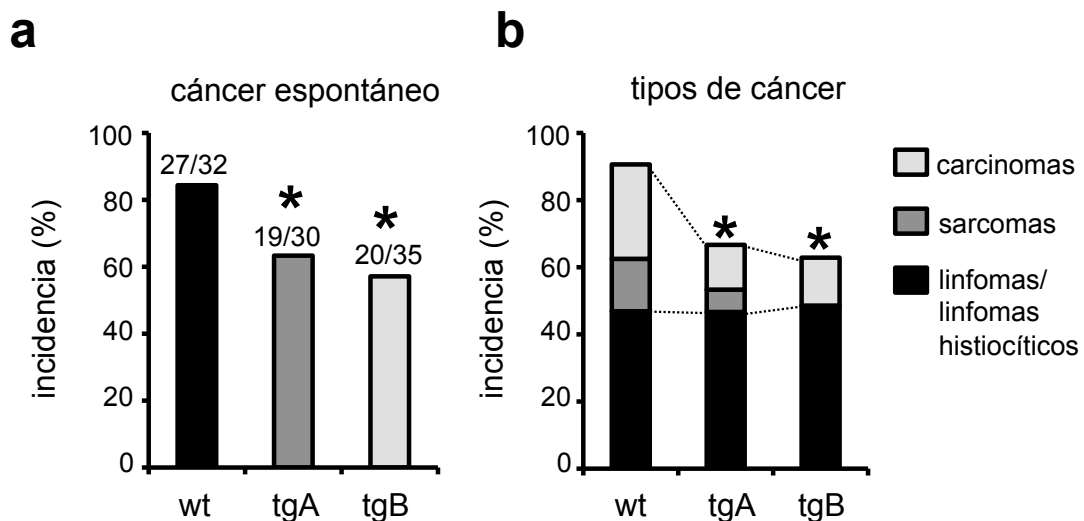


Figura 20. Incidencia espontánea de cáncer en las distintas líneas. (a) Incidencia global de tumores malignos en los ratones de las distintas líneas analizadas histopatológicamente; *: $p < 0,05$ según el test de Fischer. (b) Espectro de los tumores encontrados en los distintos animales; *: $p < 0,05$ según el test de Fischer combinando las incidencias de carcinomas y sarcomas.

20a, los ratones transgénicos para Sirt1 presentan una menor incidencia de cáncer espontáneo durante el proceso de envejecimiento, comparado con sus controles wt. Una vez observada dicha protección, quisimos profundizar más en dicho efecto y ver si Sirt1 afectaba al tipo de tumores que se observan. Así, analizamos todos los tumores malignos observados y pudimos concluir que el efecto protector de la sobreexpresión de Sirt1 parece restringido a los carcinomas y osteosarcomas, mientras que la aparición de linfomas espontáneos no se ve afectada por la presencia de mayores niveles de Sirt1 (**Figura 20b**).

III.2.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la homeostasis de la glucosa

Otra de las enfermedades más comúnmente asociadas al proceso de envejecimiento es el desarrollo de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, lo que acaba desembocando en la aparición de *diabetes mellitus* tipo II (Guarente, 2006). Previamente habíamos observado una mejor tolerancia a la glucosa en los ratones transgénicos al alimentarlos con HFD, aunque dicho efecto no se observó con SD en ratones jóvenes (**Figuras 15a y 18b**). Esto nos hizo conjeturar que Sirt1 podría igualmente ejercer un efecto protector sobre el daño acumulado con el envejecimiento y mejorar así la tolerancia a la glucosa en ratones viejos, aunque fueran alimentados con SD. Para corroborar dicha hipótesis, sometimos a ratones machos de un año y medio de edad a un GTT, y pudimos comprobar que ambas líneas de ratones transgénicos eran capaces de retirar la glucosa antes de la sangre respecto a los ratones wt, que empezaban a presentar síntomas de intolerancia a la glucosa (**Figura 21**), lo que sugiere que Sirt1 podría conferir protección frente al desarrollo de *diabetes mellitus* tipo II.

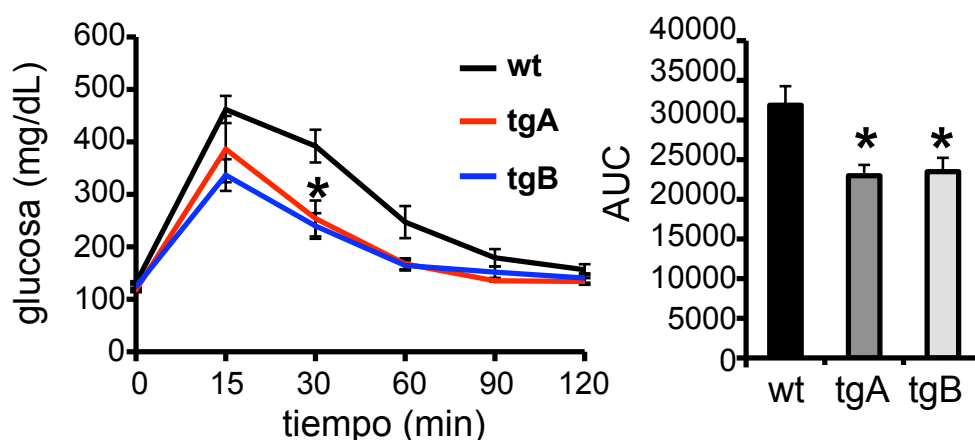
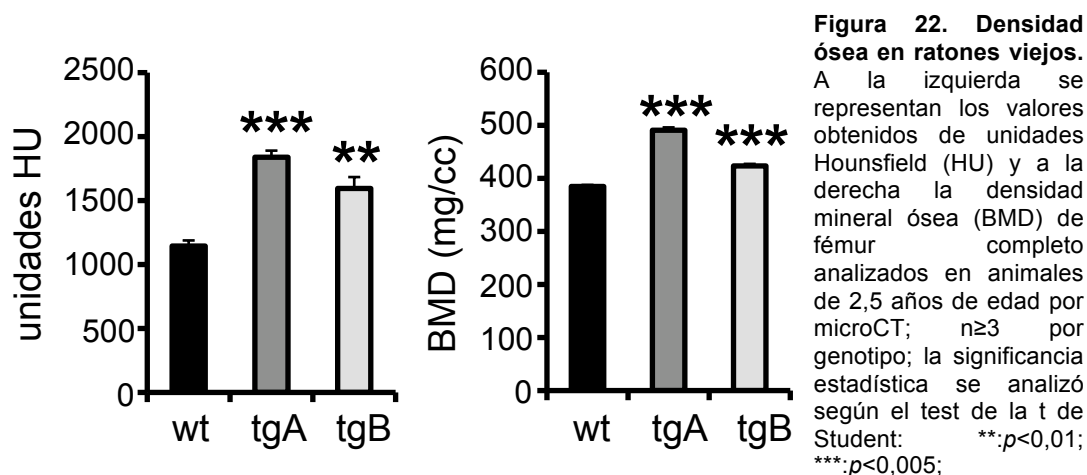


Figura 21. Homeostasis de la glucosa en ratones viejos. Test de tolerancia a la glucosa en ratones de 1,5 años de vida de los distintos genotipos. A la izquierda se representan las curvas de glucosa, y a la derecha el área bajo la curva (AUC) de las mismas; $n \geq 4$ por grupo; *: $p < 0,05$ respecto a los animales wt usando el test de la t de Student.

III.2.3. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la densidad mineral ósea

Otra de las enfermedades más frecuentemente observadas durante el proceso de envejecimiento es la osteoporosis, que es un proceso que se sabe que se ve favorecido por la acción de NF κ B (Chang *et al.*, 2009; Ruocco *et al.*, 2005). Como previamente habíamos observado una menor actividad de NF κ B en los ratones transgénicos (**Figuras 11d y 16**), pensamos que dicho efecto podría quizás verse reflejado también en una mayor densidad mineral ósea. Para comprobarlo, estudiamos *in vivo* por microCT los fémures de animales viejos (2 años y medio de edad) de cada genotipo y, de acuerdo con nuestra hipótesis, pudimos constatar una mayor densidad mineral ósea en ambas líneas de transgénicos respecto a la de sus respectivos controles (**Figura 22**), lo que sugiere que Sirt1 podría conferir protección frente al desarrollo de osteoporosis.



III.2.4. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la cicatrización de la piel y la coordinación neuromuscular

Medimos también otros indicadores del estado físico en los ratones transgénicos como la capacidad regenerativa de la piel, medida en un ensayo de cicatrización de heridas, así como el grado de coordinación muscular, medido como la capacidad de mantener el equilibrio en una barra estrecha de 1,5 cm de diámetro. De nuevo, los ratones transgénicos presentaron una mejor capacidad regenerativa de la piel (**Figura 23a**), y observamos adicionalmente una tendencia (aunque no estadísticamente significativa) hacia una mejor coordinación neuromuscular (**Figura 23b**).

Todos estos datos apoyan la idea de que Sirt1 confiere protección frente a algunas de las patologías que están asociadas al envejecimiento.

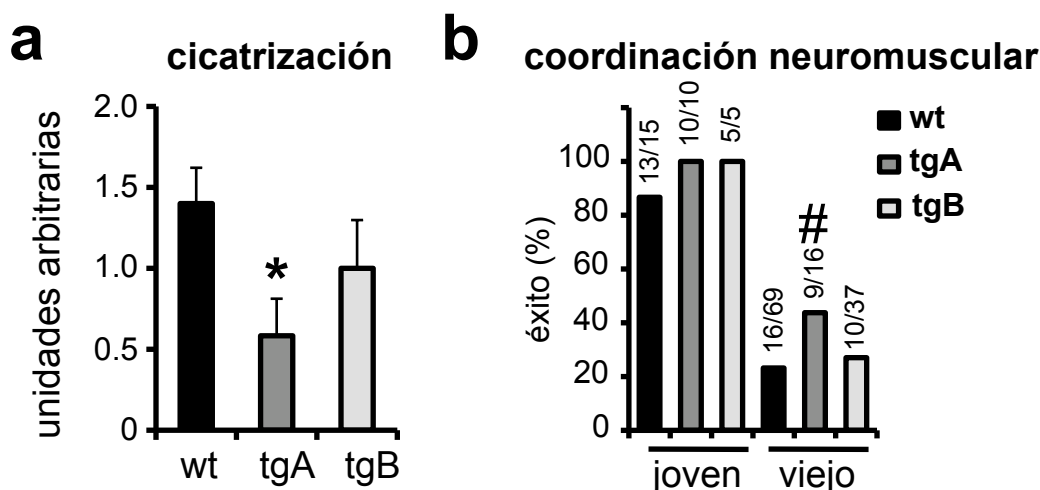


Figura 23. Otros indicadores del estado físico. (a) Ensayo de regeneración o cicatrización de la piel en ratones mayores de 2 años. Se representa la capacidad de regeneración en unidades arbitrarias, siendo 0 una cicatrización total, y 2 una práctica ausencia de cicatrización, como se explica en Materiales y Métodos; $n \geq 10$ por grupo; *: $p < 0,05$ usando el test de la t de Student. (b) Ensayo de coordinación neuromuscular o *tightrope* en ratones jóvenes (<6 meses) o viejos (>2 años). Se representa el porcentaje de ratones que pasó con éxito dicho test, como se explica en la sección de Materiales y Métodos; #: $p < 0,1$ usando el test de Fischer.

III.3. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre marcadores moleculares asociados al proceso de envejecimiento

Para evaluar los efectos del aumento en la cantidad de Sirt1 sobre el envejecimiento a un nivel más molecular, medimos dos de los marcadores más estrechamente asociados al envejecimiento, como son el aumento en los niveles de mRNA de $p16^{\text{Ink4a}}$ (Krishnamurthy *et al.*, 2004), así como la acumulación de focos de daño en el ADN (Sedelnikova *et al.*, 2004). En cuanto a $p16^{\text{Ink4a}}$, los niveles de mRNA medidos por qRT-PCR en hígados de animales wt viejos aumentaron entorno a 15 veces respecto a los controles jóvenes, mientras que dicho incremento se vio muy reducido en los animales transgénicos tanto de la línea tgA como de la línea tgB (**Figura 24a**). Más aún, la acumulación de focos de daño en el ADN medido por los focos de la proteína 53BP1 en cortes de hígado de los distintos genotipos, reveló que los animales transgénicos acumulaban una menor cantidad de células con daño en el ADN (**Figura 24b**). Ambos resultados nos llevan a reforzar la idea de que Sirt1 protege del envejecimiento en los mamíferos, tanto a nivel fisiológico en cuanto a enfermedades comunes del envejecimiento (*diabetes mellitus* tipo II, osteoporosis, capacidad regenerativa de la piel, etc.), como a nivel molecular, con un menor

incremento en marcadores asociados al envejecimiento (niveles de $p16^{\text{Ink4a}}$ así como de células con focos de daño en el ADN).

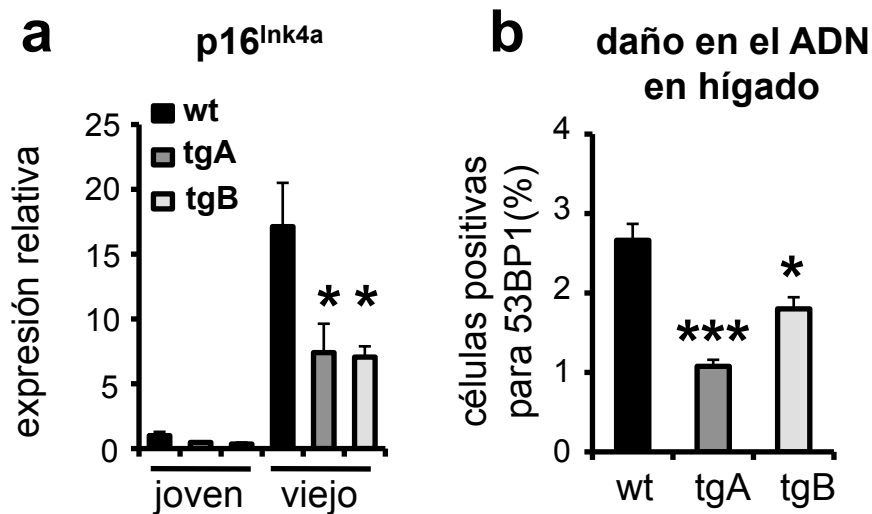


Figura 24. Marcadores moleculares de envejecimiento. (a) Niveles de ARNm de $p16^{\text{Ink4a}}$ por qRT-PCR en hígados de animales jóvenes (<6 meses) o viejos (>2 años); $n \geq 3$ por grupo. (b) Número de células en hígado de ratones viejos (>2 años) que presentan focos de 53BP1 medido por microscopía confocal, como se explica en Materiales y Métodos; $n \geq 3$ por genotipo. En todos los casos, se hizo el análisis estadístico mediante el test de la t de Student; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$.

IV. Análisis del efecto de Sirt1 sobre el desarrollo de cáncer

Una vez analizado el efecto de Sirt1 sobre el envejecimiento, y alentados por el resultado obtenido en cuanto a la protección frente al desarrollo espontáneo de tumores, quisimos estudiar el efecto de dicha sobreexpresión sobre la generación de tumores, bien inducidos por carcinógenos químicos o bien inducidos genéticamente.

IV.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre el desarrollo de cáncer inducido químicamente

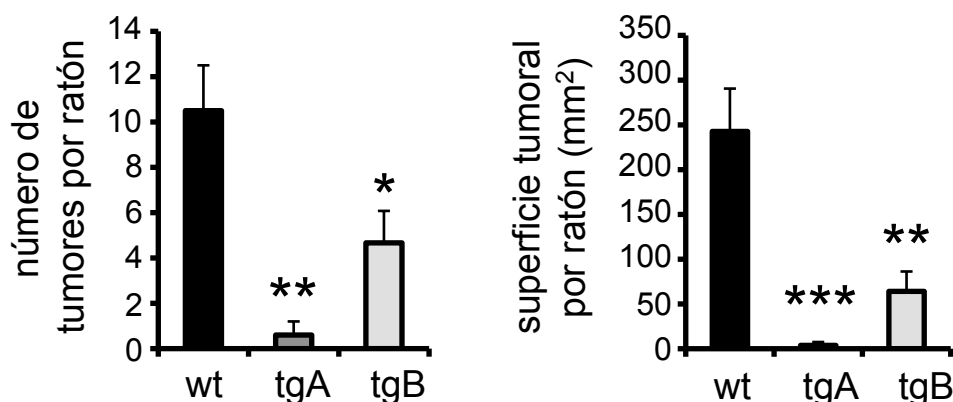
IV.1.1. Sirt1 protege del desarrollo de cáncer de hígado asociado a síndrome metabólico

A pesar de que los datos publicados previamente al comienzo de este estudio y obtenidos *in vitro* sugerían un potencial oncogénico para Sirt1 (Luo *et al.*, 2001; Pruitt *et al.*, 2006; Vaziri *et al.*, 2001), nuestros datos de cáncer asociado al envejecimiento, así como otros resultados publicados simultáneamente durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, sugerían por el contrario que Sirt1 podría

tener un papel supresor de tumores *in vivo*. En concreto, se publicó que Sirt1 protegía del desarrollo de linfomas *in vivo* en ratones heterocigotos para p53 (Oberdoerffer *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008), así como del desarrollo de pólipos intestinales en el modelo APC^{min} (Firestein *et al.*, 2008). Motivados además por la protección descrita previamente en relación con el daño metabólico asociado a HFD, quisimos extender los estudios sobre el desarrollo de cáncer a un modelo muy relevante para la población humana, como es el cáncer de hígado asociado a síndrome metabólico. Como ya hemos comentado, el síndrome metabólico es una enfermedad que afecta aproximadamente al 25% de la población adulta en el mundo occidental, y se caracteriza por la combinación de ciertos parámetros fisiopatológicos, entre los que se incluyen la obesidad, la inflamación, la intolerancia a la glucosa, la dislipidemia, así como la elevación en la presión arterial (Guarente, 2006), y está asociado principalmente a las dietas ricas en grasa y a la inactividad física. Por todo ello, desarrollamos un modelo de cáncer de hígado inducido por una única inyección intraperitoneal del carcinógeno hepático dietilnitrosamina (DEN)

a

Tumores hepáticos inducidos por DEN/HFD

**b**

wt

tg

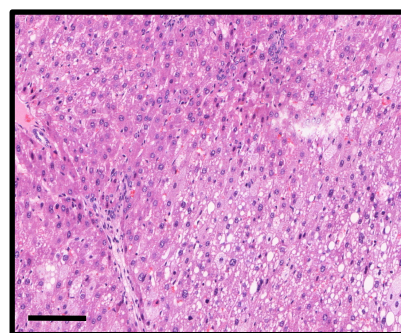
c

Figura 25. Sirt1 protege del desarrollo de cáncer hepático asociado a síndrome metabólico. (a) Número de tumores (izquierda) y superficie ocupada (derecha) por ratón medidos por microCT, 11 meses después del tratamiento con DEN, y mantenidos con HFD permanentemente. (b) Foto representativa de hígados de animales wt y tg hermanos de camada. (c) Tinción con H/E representativa de un carcinoma. La barra corresponde a 100 µm; n≥5 por genotipo; el análisis estadístico se hizo mediante el test de la t de Student; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,005$.

en machos de 16 días de vida seguida, tras el destete, por la alimentación continuada con HFD. Así, todos los animales wt analizados por microCT a los 11 meses de inyectar el DEN presentaban múltiples tumores en el hígado, observándose una media de entorno a 10 tumores por animal. De forma notable, los correspondientes hermanos de camada transgénicos, tanto de la línea tgA como de la línea tgB, presentaban una incidencia drásticamente menor en el número de tumores (**Figura 25a**), diferencia que se puede apreciar también en la foto post-necropsia de animales hermanos de camada wt y transgénicos (**Figura 25b**). Conviene resaltar que el análisis histopatológico de los tumores confirmó que correspondían en todos los casos a carcinomas hepáticos, como se puede observar en la H/E representativa de la **Figura 25c**.

Una vez obtenido este resultado, nos preguntamos si la protección observada gracias a Sirt1 podía reflejar no sólo la protección descrita anteriormente frente a la HFD, sino también un efecto protector inicial frente al daño del DEN. Para ello, la mejor forma sería realizar el protocolo en ausencia de tratamiento concomitante con HFD, sin embargo, los ratones utilizados en estos experimentos habían sido retro-cruzados hasta un fondo que era ya >99% C57BL6, y el DEN es un carcinógeno muy pobre por sí mismo en dicho fondo genético (Sun *et al.*, 2008). De hecho, y realizado de forma previa al experimento con HFD, realizamos un experimento de prueba en animales wt con SD, y observamos que más del 50% de los animales no presentaban ni un sólo tumor a los 11 meses de ensayo, por lo que observar un efecto protector y que fuera estadísticamente significativo en los ratones transgénicos, teniendo de partida una cantidad tan baja de tumores en los animales wt, conllevaría usar una cantidad prohibitivamente alta de animales. En su lugar, decidimos analizar el efecto a tiempo corto (48 horas) del DEN en los hígados de animales wt o transgénicos alimentados con SD, ya que dicho efecto se sabe que es un indicador fidedigno del desarrollo final de los tumores (Maeda *et al.*, 2005). El DEN es un carcinógeno químico que dispara una cascada de acontecimientos en el hígado que ha sido estudiada con profundidad previamente, y que incluye la generación de daño en el ADN y la apoptosis de los hepatocitos centro-lobulares, la producción de citoquinas proinflamatorias y la generación de una respuesta proliferativa compensatoria que, finalmente, es la que se piensa que lleva a la generación de los tumores con el paso del tiempo (Maeda *et al.*, 2005). Así, investigamos primeramente la lesión hepática temprana determinando los niveles de la alanina aminotransferasa (ALT) en sangre, y observamos que los ratones transgénicos presentan niveles mucho menores de ALT a las 48 horas de la

inyección con DEN, respecto a sus controles wt (**Figura 26a**). Además, el análisis inmunohistoquímico de cortes de hígados tratados con DEN reveló que los animales wt presentaban una intensa respuesta de daño al ADN, medida por la tinción de

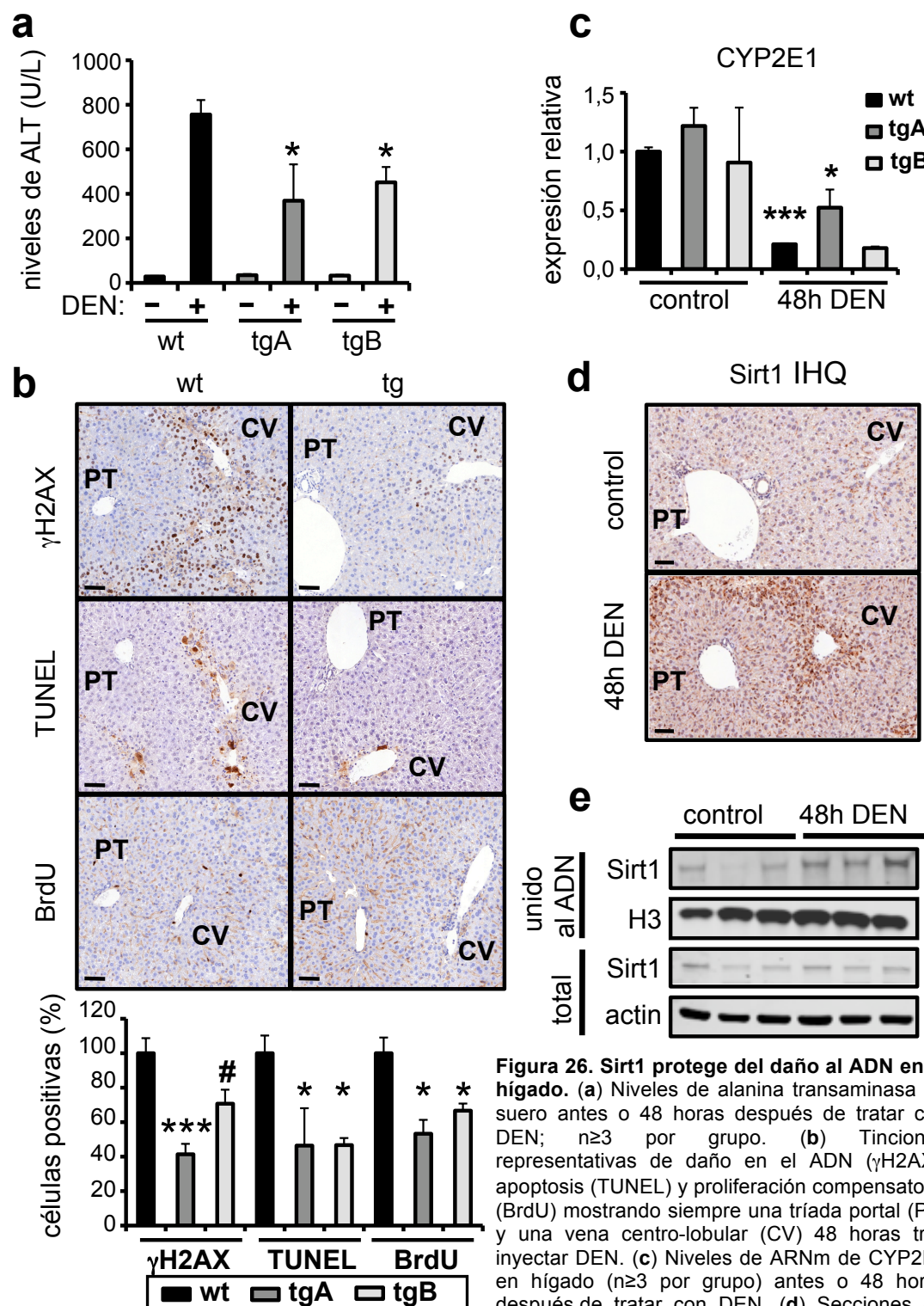


Figura 26. Sirt1 protege del daño al ADN en el hígado. (a) Niveles de alanina transaminasa en suero antes o 48 horas después de tratar con DEN; $n \geq 3$ por grupo. (b) Tinciones representativas de daño en el ADN (γ H2AX), apoptosis (TUNEL) y proliferación compensatoria (BrdU) mostrando siempre una tríada portal (PT) y una vena centro-lobulillar (CV) 48 horas tras inyectar DEN. (c) Niveles de ARNm de CYP2E1 en hígado ($n \geq 3$ por grupo) antes o 48 horas después de tratar con DEN. (d) Secciones de hígado teñidas contra Sirt1 antes o 48 horas después de tratar con DEN. (e) Niveles de proteína de Sirt1 unidos a la cromatina o niveles totales en extractos de hígado ($n=3$) antes o 48 horas después de inyectar DEN. La significancia estadística se determinó utilizando el test de la t de Student respecto al wt; #: $p < 0,1$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,005$. Las barras en las IHQ indican 50 μ m.

γ H2AX, acompañada por unos elevados niveles de apoptosis en los hepatocitos medida por la hibridación TUNEL, así como una elevada respuesta de proliferación compensatoria, medida por la tinción de BrdU. Sin embargo, los ratones transgénicos mostraban unos niveles de daño en el ADN muy reducidos en comparación con sus controles wt y, consecuentemente, presentaban menor número de hepatocitos en apoptosis y una menor respuesta de proliferación compensatoria (**Figura 26b**). Todos estos datos, sin embargo, podrían reflejar simplemente un mejor metabolismo hepático del DEN gracias a Sirt1 así que, para explorar esta posibilidad, analizamos los niveles de mRNA del citocromo P450 CYP2E1, que es el principal citocromo implicado en el metabolismo y bio-activación del DEN, de forma que los animales KO para dicho citocromo son altamente resistentes al desarrollo de estos tumores (Kang *et al.*, 2007). Observamos que el tratamiento con DEN produce una disminución en los niveles de dicho citocromo como ya se había publicado previamente (Freeman *et al.*, 1992), sin embargo, no pudimos observar ninguna diferencia entre los distintos genotipos, lo que sugiere que Sirt1 no está afectando al metabolismo del DEN (**Figura 26c**).

La drástica reducción en el daño en el ADN en los ratones transgénicos, junto con el dato mostrado previamente de una menor cantidad de daño en el ADN asociado al envejecimiento en los hígados de los animales transgénicos nos llevó a conjeturar que Sirt1 podría estar respondiendo activamente al DEN, resultando así en un menor daño en el ADN. De hecho, la tinción inmunohistoquímica de Sirt1 en hígados tratados con DEN permite observar una fuerte tinción nuclear en los hepatocitos cercanos al área centro-lobular (**Figura 26d**), que es el área del hígado más sensible a la acción de los tóxicos hepáticos y la que presenta mayores niveles de apoptosis (**Figura 26b**). Este resultado, junto con lo descrito anteriormente, nos hizo pensar que Sirt1 estaba uniéndose *in vivo* a la cromatina tras el tratamiento con el DEN, y eso podría explicar la protección frente al daño provocado por el DEN. Además, durante la realización del presente estudio se publicó un trabajo en el que se observó que el tratamiento de células madre en cultivo con agentes genotóxicos promueve el reclutamiento de Sirt1 a la cromatina (Oberdoerffer *et al.*, 2008), lo que apoyaba nuestra hipótesis. Para intentar corroborar dicha hipótesis, aislamos la cromatina en extractos de hígados controles o tratados con DEN, y analizamos por Western Blot el reclutamiento de Sirt1 a la misma. A pesar de la probable dilución de dicho efecto debido a todos los hepatocitos que no presentasen daño al ADN, pudimos observar un claro aumento en la cantidad de Sirt1 unida a la cromatina, mientras que los niveles totales de Sirt1 permanecían inalterados (**Figura 26e**). A

nivel mecanístico, este reclutamiento parece estar mediado por ATM, al menos en parte, ya que los ratones ATM-KO no presentan dicho aumento tras ser tratados con DEN, como se puede apreciar en la **Figura 27**.

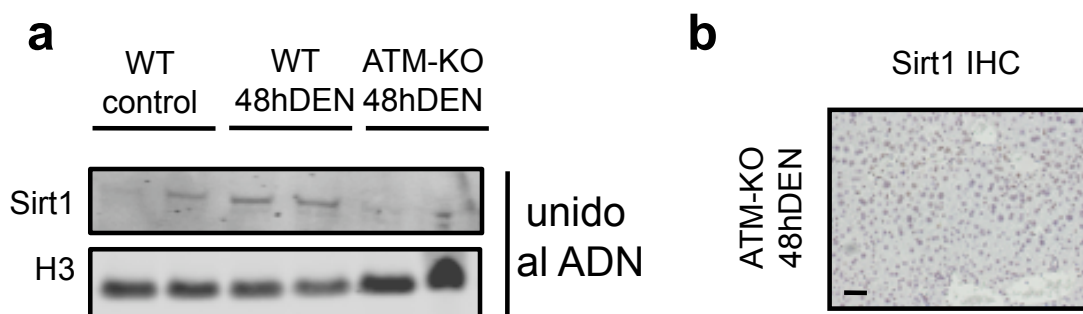
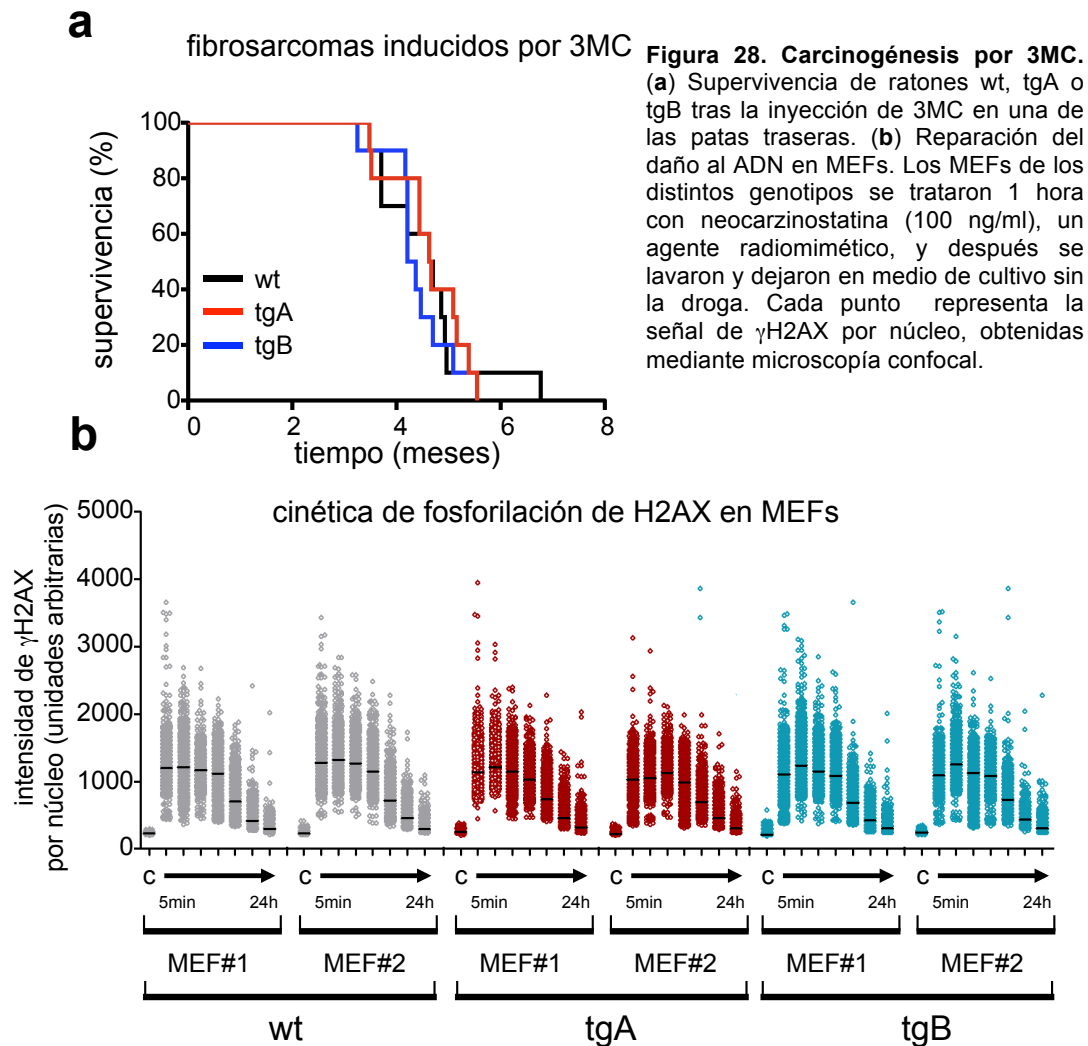


Figura 27. El reclutamiento de Sirt1 a la cromatina es dependiente de ATM. (a) Niveles de Sirt1 unidos a la cromatina en hígados wt control, tratados con DEN, o hígados ATM-KO tratados con DEN. (b) Sección de hígado ATM-KO teñida para Sirt1 tras haber sido tratado con DEN. La barra indica 50 μm. En ambos casos se aprecia menos cantidad de Sirt1 unida a la cromatina respecto a lo observado en animales wt.

En conjunto, todos estos datos nos llevan a concluir que Sirt1 protege del desarrollo de cáncer hepático asociado a síndrome metabólico por dos vías distintas, en primer lugar, por la protección frente al daño hepático temprano causado por el DEN y, en segundo lugar, por la protección del daño hepático crónico generado por la HFD.

IV.1.2. Sirt1 no afecta a la generación de fibrosarcomas inducidos por 3-metilcolantreno (3MC)

Tras observar la protección frente al desarrollo de carcinomas hepáticos por el protocolo combinado de DEN/HFD, quisimos comprobar si dicha protección era extensible también a otros tejidos del organismo y, para ello, utilizamos el protocolo de inducción de fibrosarcomas por inyección intramuscular de 3MC en una de las patas traseras del ratón, que es un protocolo que se ha utilizado de forma rutinaria en el laboratorio de Manuel Serrano. Este agente forma aductos con el ADN que provocan numerosas mutaciones, derivando en la formación de fibrosarcomas, tumores sólidos de origen fibroblástico con escasa capacidad metastática que, pasado cierto tiempo tras la administración del carcinógeno, se desarrollan con gran rapidez en la zona de inyección (Wexler and Rosenberg, 1979), y son altamente dependientes del status de p53 y p19ARF, como se ha descrito en nuestro laboratorio con anterioridad (Efeyan *et al.*, 2006; Garcia-Cao *et al.*, 2002; Matheu *et al.*, 2004). Como podemos observar en la **Figura 28a**, la sobreexpresión de Sirt1 no afecta ni positiva ni negativamente al desarrollo de los fibrosarcomas. Consistentemente con este resultado, el análisis hecho en colaboración



con el grupo del Dr. Óscar Fernández-Capetillo de MEFs de los distintos genotipos tratados con un agente radiomimético como es la neocarzinostatina, demostró que dichos MEFs presentan cinéticas similares de fosforilación de H2AX (**Figura 28b**). Este resultado nos lleva a concluir que Sirt1 protege del daño al ADN en los hepatocitos, pero no en los fibroblastos, resultando en una eficaz protección frente al desarrollo de tumores por DEN/HFD pero no observándose efecto alguno en el desarrollo de fibrosarcomas inducidos por 3MC.

IV.2. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre el desarrollo de cáncer inducido genéticamente

A pesar de haber hecho ya estudios de carcinogénesis química en los ratones que sobreexpresan Sirt1, quisimos también realizar estudios genéticos de carcinogénesis y así ahondar más en la comprensión de la relación entre Sirt1 y el desarrollo de cáncer. Además, la carcinogénesis genética es, en principio, una forma

mucho más limpia y elegante para estudiar el impacto de una manipulación concreta (ya sea genética, como en nuestro caso, ya sea mediante el tratamiento con fármacos) sobre el desarrollo de los tumores. Para ello, por medio de cruces, se colocaron los transgenes de Sirt1 en fondos genéticos proclives a desarrollar ciertos tipos de tumores. A continuación, detallamos todos los estudios realizados (en muchos casos todavía en marcha, y aún no finalizados).

IV.2.1. Ratones Sirt1-tg/p53-KO

El primer cruce que quisimos hacer fue el necesario para llevar los transgenes de Sirt1 hasta un fondo p53-KO. p53 es uno de los genes supresores de tumores más importantes y conocidos, ya que este ratón lleva estudiándose en profundidad muchos años, y es una herramienta que se ha utilizado de forma rutinaria en el laboratorio de Manuel Serrano. En concreto, los ratones KO para p53 desarrollan espontáneamente linfomas muy agresivos a los pocos meses de edad (Donehower *et al.*, 1992; Harvey *et al.*, 1993). Además, nos interesaba especialmente investigar los efectos de este cruce genético ya que la CR y el ayuno intermitente habían demostrado que eran efectivos para retrasar el desarrollo de tumores en un fondo genético KO o heterocigoto para p53 (Berrigan *et al.*, 2002; Hursting *et al.*, 1994), por lo que el resultado final en cuanto a la supervivencia de estos ratones podría indicarnos si la sobreexpresión de Sirt1 en mamíferos recapitula dicho efecto de la CR.

Así, cruzamos la línea de ratones transgénicos tgA (la línea tgB está en marcha) con ratones heterocigotos para p53 hasta obtener ratones tgA en fondo p53-KO y, a continuación, estudiamos la supervivencia y aparición de tumores en dichos ratones. Como se puede apreciar en la **Figura 29a**, no pudimos observar ninguna diferencia entre las distintas curvas de supervivencia y, más aún, el análisis del espectro de tumores entre los ratones p53 KO y los ratones p53-KO/tgA no evidenció ninguna diferencia entre ambas líneas tampoco (**Figura 29b**).

Adicionalmente, decidimos repetir el experimento sometiendo a los ratones a ayuno en días alternos (EOD) desde el destete para ver si, al activar la respuesta al ayuno, la sobreexpresión de Sirt1 confería una protección sinérgica frente al desarrollo de los tumores. Sin embargo, como se puede apreciar en la **Figura 29a**, nuevamente no conseguimos apreciar la diferencia esperada. Así, mientras que los animales p53-KO parecen responder efectivamente al tratamiento con EOD, y se ve un retraso significativo en la aparición de tumores, los ratones p53-KO/tgA

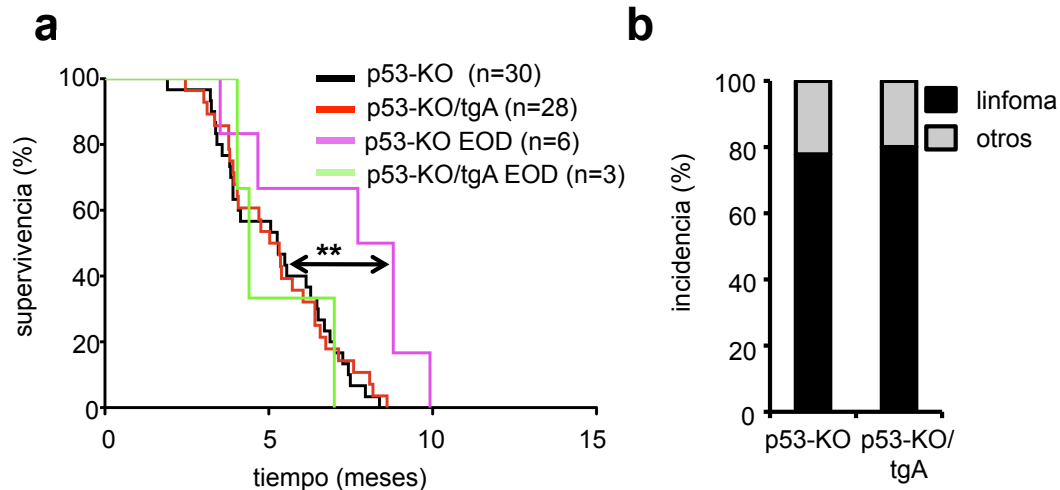


Figura 29. Ratones p53-KO/tgA. (a) Supervivencia en ratones p53-KO o p53-KO/tgA, tanto en condiciones normales como sometidos a un tratamiento de ayuno en días alternos (EOD). La significancia estadística se analizó usando el Logrank test; **: $p < 0,01$. (b) Espectro de tumores en los animales p53-KO o p53-KO/tgA en condiciones normales.

no presentan un retraso aún mayor. De hecho, los ratones analizados hasta ahora aparentan desarrollar los tumores antes que sus controles p53-KO con EOD, aunque esa diferencia sea resultado probablemente de la poca cantidad de animales p53-KO/tgA en EOD que hemos podido analizar hasta la fecha. Estos resultados, aunque preliminares, nos llevan a cuestionar la mediación de Sirt1 en mamíferos de los efectos de la CR sobre el cáncer.

II.2. Ratones Sirt1-tg/PTEN-het

Otro de los principales genes supresores de tumores es PTEN (phosphatase and tensin homolog). La haploinsuficiencia de PTEN (la eliminación en homocigosis es letal) conlleva la aparición de numerosas neoplasias, entre las que nos encontramos con severos síndromes linfoproliferativos, adenocarcinomas de tiroides de tipo folicular y feocromocitomas, junto con la aparición de PINs (neoplasias intraepiteliales de próstata) de alto grado, que en algún caso pueden llegar a carcinomas *in situ* (Di Cristofano *et al.*, 1999; Di Cristofano *et al.*, 1998; Podsypanina *et al.*, 1999). Es importante destacar que una de las principales funciones de PTEN es atenuar la vía de señalización de PI3K al defosforilar el PIP₃ generado en dicha vía (se muestra un esquema en la Discusión, en la **Figura 41**). Esta ruta se encuentra activada aberrantemente en numerosos tipos de cáncer pero, además, es la vía que se encarga de transducir la señal de la insulina, de forma que una menor actividad de PTEN se traduce en una mayor sensibilidad a la insulina (Wong *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que Sirt1 juega un papel también en la homeostasis de la

glucosa, como habíamos observado previamente (**Figuras 15, 18 y 21**), y teniendo en cuenta además que existía un estudio previo que asociaba una elevada expresión en ratón y en humanos de Sirt1 con cáncer de próstata (Huffman *et al.*, 2007), que es una de las patologías que se ven precisamente acrecentadas por la deficiencia de PTEN, conjeturamos que Sirt1 podría cooperar con el déficit de PTEN y, por lo tanto, acelerar el desarrollo de las patologías asociadas a su déficit.

Para explorar dicha posibilidad, cruzamos los ratones Sirt1-tgA con ratones PTEN-het hasta conseguir cohortes de animales PTEN-het y animales PTEN-het/tgA, de forma que pudiéramos estudiar la posible cooperación entre ambos efectos. Sometimos a los ratones a un GTT como primer acercamiento para estudiar el impacto *in vivo* de dicha sobreexpresión en la funcionalidad de la vía de PTEN. De forma consistente con nuestra hipótesis, la sobreexpresión de Sirt1 coopera con la deficiencia de PTEN de forma que los ratones PTEN-het/tgA retiran la glucosa de la sangre antes que el resto de los genotipos estudiados (la diferencia es significativa a los 90 minutos de comenzar el ensayo, y es casi significativa en el AUC) aún tratándose de un bajo número de animales, y a pesar de que todos ellos eran muy jóvenes (≤ 2 meses), presentaban buen estado de salud, y habían sido mantenidos todos con SD (**Figura 30**).

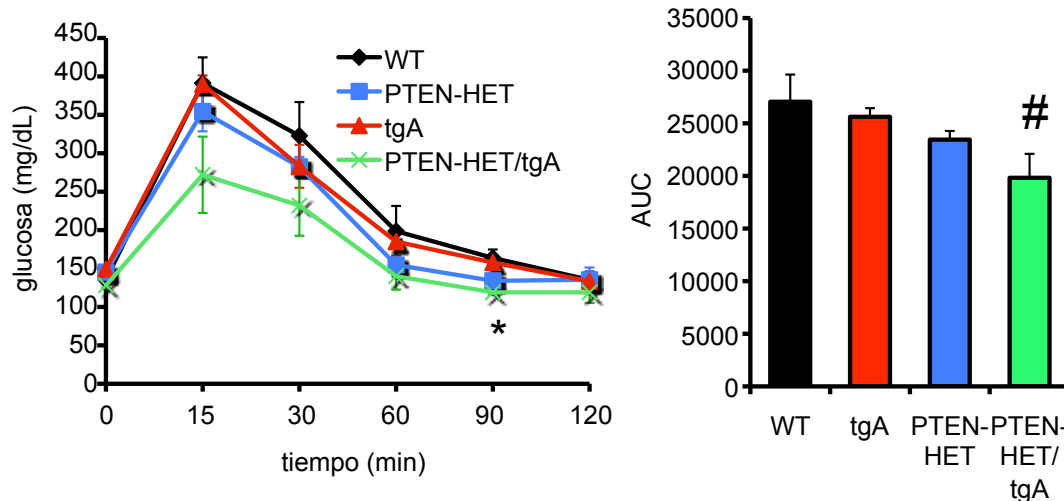
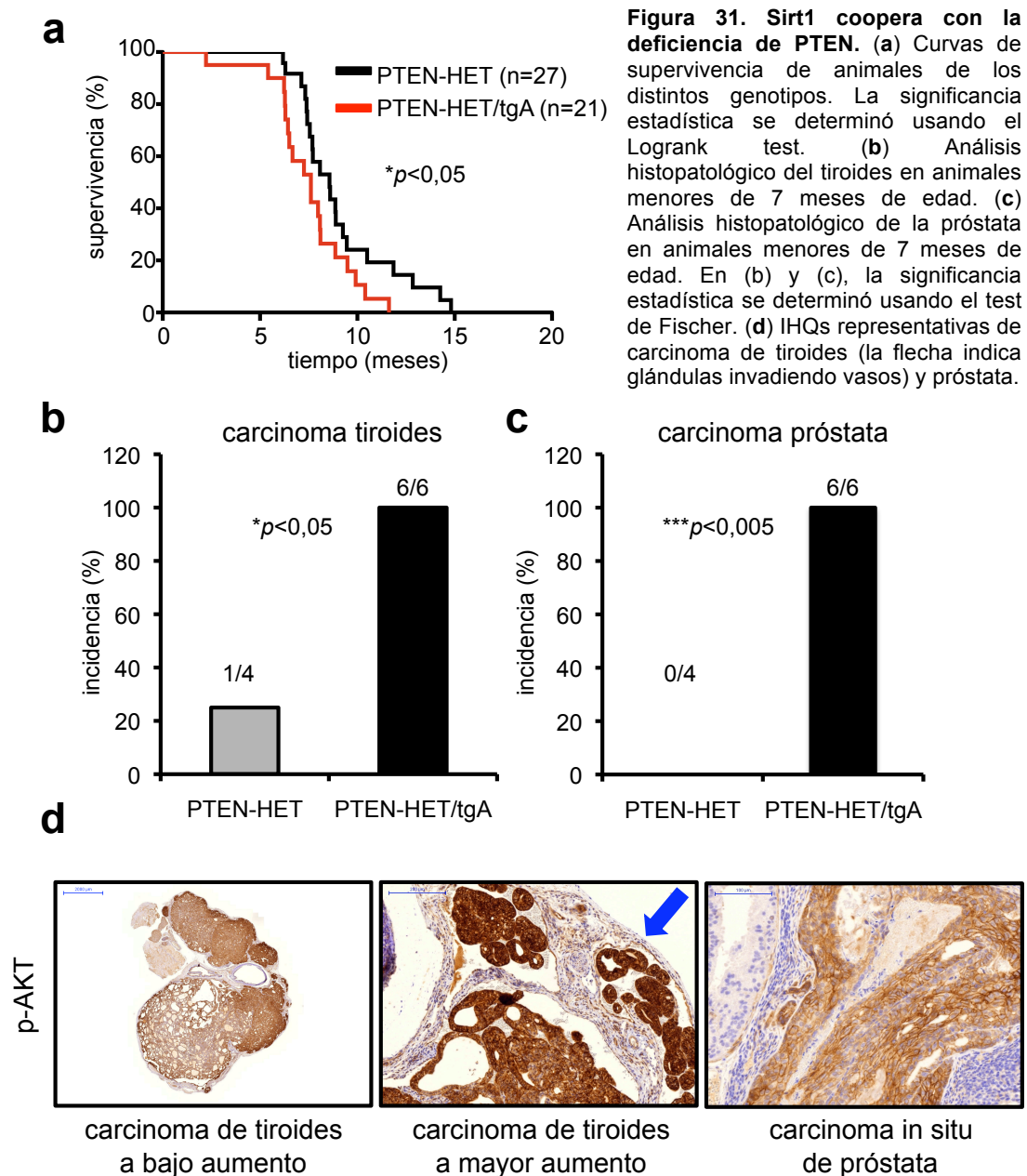


Figura 30. Tolerancia a la glucosa. Ratones de los distintos genotipos fueron sometidos a un GTT, las curvas se representan a la izquierda, y el área bajo la curva (AUC) a la derecha; $n \geq 3$ por grupo; la significancia estadística se analizó mediante el test de la t de student respecto a los ratones wt; #: $p < 0,1$; *: $p < 0,05$.

Seguidamente, analizamos la supervivencia de las diferentes cohortes de animales, observando una aceleración en la muerte de los animales PTEN-HET/tgA (**Figura 31a**). La principal causa por la que es necesario sacrificar a los animales heterocigotos para PTEN reside en el desarrollo de adenocarcinoma de tiroides que comprime consecuentemente la tráquea, dificultando enormemente la respiración en

dichos animales. Este hecho normalmente se ve acompañado de un severo desorden linfoproliferativo que, en muchas ocasiones, cursa con un crecimiento concomitante de los ganglios submaxilares (entre otros), de forma que la compresión sobre la tráquea se ve acrecentada. En nuestro caso, la observación de los animales sugería que en la mayoría o en todos los animales PTEN-HET/tgA, la causa de muerte parecía ser la compresión de la tráquea por un crecimiento exagerado del tiroides, lo que nos llevó a pensar que Sirt1 estaba acelerando la aparición de dicho carcinoma. Por ello, decidimos analizar histopatológicamente animales más jóvenes (≤ 7 meses) para ver si se observaba una aceleración en la aparición del carcinoma de tiroides. De forma consistente con lo observado previamente, todos los ratones PTEN-het/tgA analizados presentaban ya



adenocarcinoma de tiroides a los 7 meses de edad, caracterizado por una intensa tinción de p(S473)AKT en membrana, acompañado por glándulas tiroideas que invaden ya los vasos como se puede apreciar en la IHQ (**Figura 31d**), mientras que sólo un 25% de los animales simples heterocigotos para PTEN presentaban dicho carcinoma en ese punto temporal (**Figura 31b y 31d**). Asimismo, el análisis de las próstatas en esos animales volvió a dar como resultado una aceleración en la aparición de carcinoma *in situ* en los animales PTEN-HET/tgA (**Figura 31c y 31d**), no obstante, dichos carcinomas nunca llegaban a progresar a carcinomas invasivos de alto grado, aún en los animales PTEN-HET/tgA más longevos, lo que nos hizo especular que, con alta probabilidad, el fenómeno de disminución en la supervivencia de los ratones venía determinado fundamentalmente por la aceleración en el desarrollo de cáncer tiroideo.

Una vez tuvimos este resultado, decidimos investigar los niveles de p(S473)AKT específicamente en los tiroides de animales más jóvenes, a un tiempo de 2 meses de edad, edad a la que se pueden ver hiperproliferaciones pero todavía no se presentan adenocarcinomas (**Figura 32**). De esta forma, podríamos determinar si, previamente a la aparición de los adenocarcinomas, conseguíamos observar un aumento en los niveles de fosforilación de AKT que pudiera explicarnos dicha

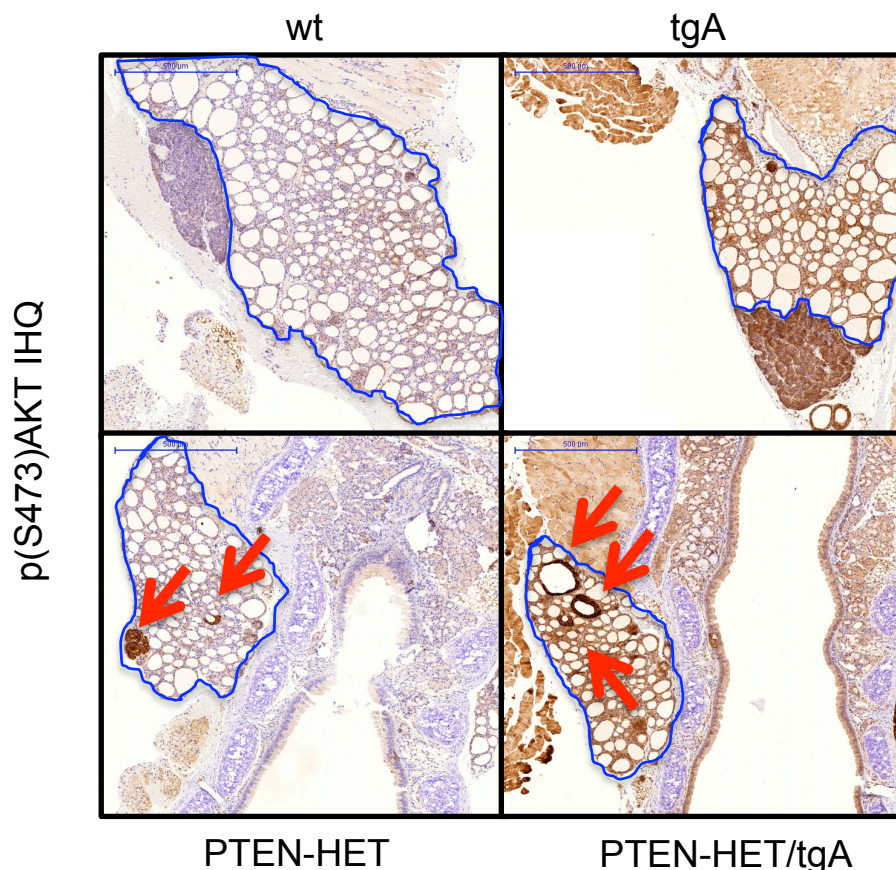


Figura 32. Tinción de p(S473)AKT en tiroides de animales de 2 meses de edad de los distintos genotipos. El tiroides está delimitado por la línea azul, mientras que las hiperproliferaciones tiroideas mostrando tinción de membrana para p(S473)AKT se indican con flechas rojas.

aceleración. Así, realizamos Western Blots usando extractos de tiroides de animales de los distintos genotipos y, al analizar los niveles de pAKT (tanto S473 como T308), observamos que los animales que sobreexpresaban Sirt1 en un fondo deficiente para PTEN presentaban mayores niveles de fosforilación de AKT de partida (**Figura 33**), lo que permite explicar la aceleración en el desarrollo del carcinoma de tiroides. Sin embargo, no pudimos apreciar diferencias en los niveles totales de PTEN, lo que sugiere que Sirt1 no afecta directamente a la expresión de esta proteína. Además, al analizar también extractos de próstata de dichos animales, observamos una ligera tendencia (aunque no tan clara como en tiroides) hacia un aumento en los niveles de fosforilación de AKT, lo que es nuevamente compatible con la aceleración en la malignización del carcinoma de próstata

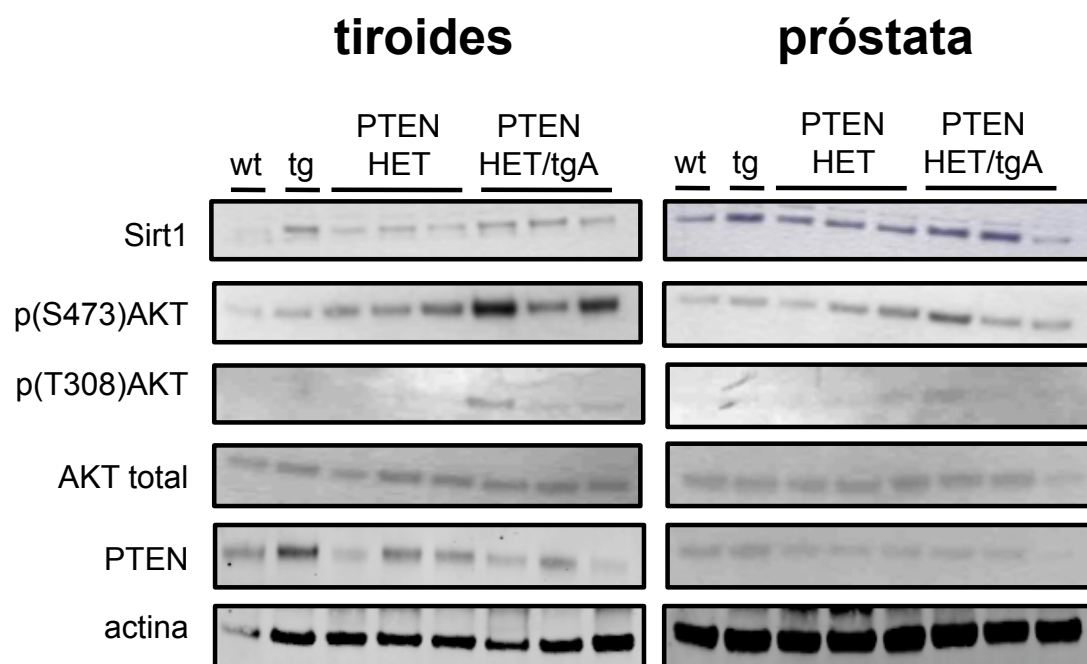


Figura 33. Western Blots en tiroides y próstatas de animales de 2 meses de edad. La sobreexpresión de Sirt1 en un fondo deficiente para PTEN conlleva un aumento de los niveles de pAKT.

Tras obtener estos resultados que nos sugerían que Sirt1 podría jugar un papel oncogénico en el desarrollo de cáncer tiroideo en ratón, nos preguntamos si podría jugar un papel similar en los humanos. Para ello, analizamos un TMA (en colaboración con la Dra. Mercedes Robledo y el Dr. Xavier Matias-Guiu) con 49 muestras de pacientes con carcinoma de tiroides, junto con sus correspondientes controles de tejido no tumoral y, de forma importante, observamos que Sirt1 se ve claramente sobreexpresado en las muestras tumorales con respecto a las muestras de tejido normal (**Figura 34**). Todo ello nos lleva a proponer que Sirt1 ejerce probablemente un papel oncogénico en el desarrollo de cáncer tiroideo tanto en ratón como en humano.

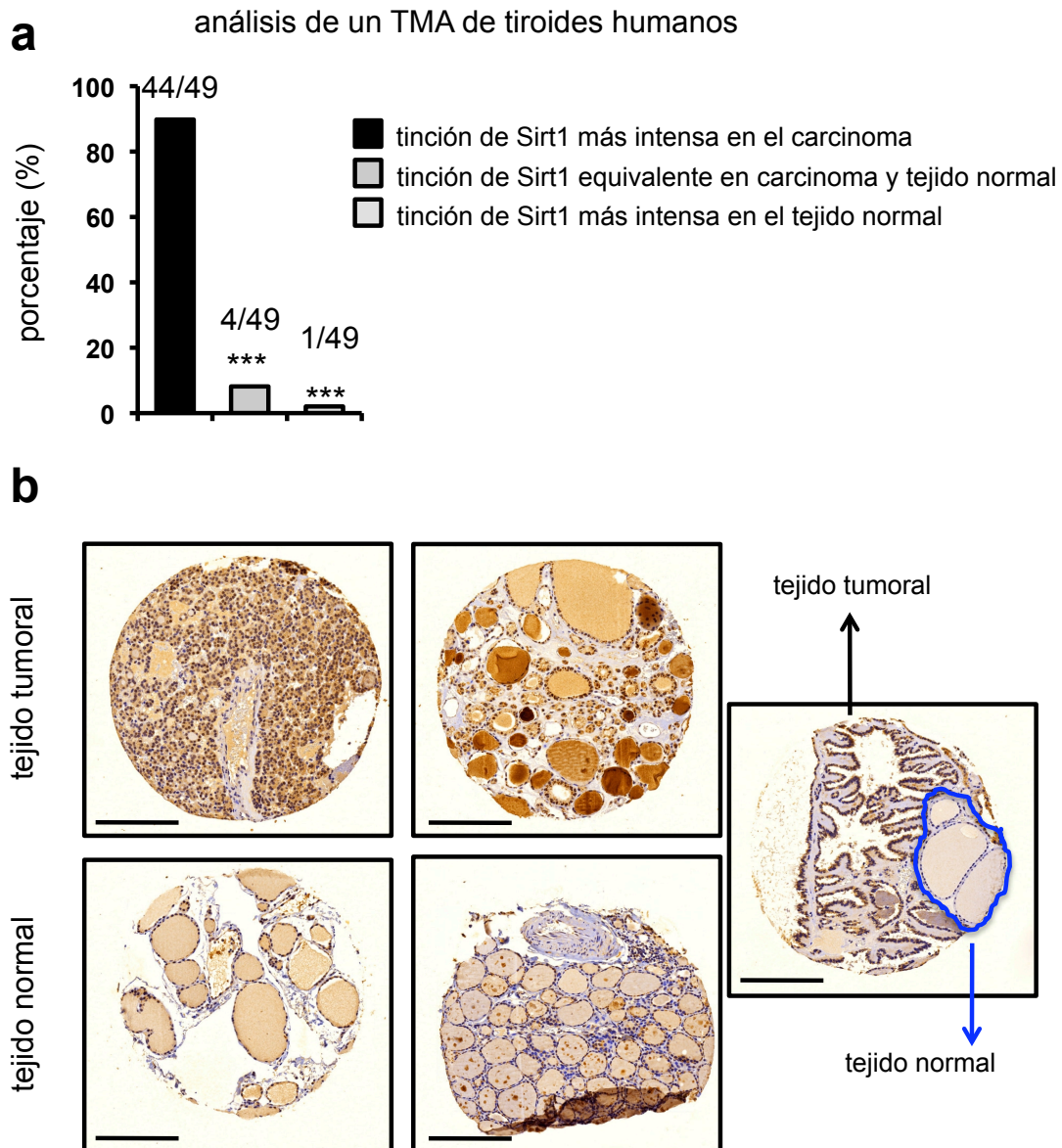


Figura 34. Sirt1 se encuentra sobreexpresado en muestras humanas de carcinoma de tiroides. (a) Porcentaje de casos de carcinoma de tiroides con mayor, igual o menor expresión de Sirt1 respecto a sus respectivas muestras de tejido no tumoral, analizados en un TMA con 49 muestras; ***: $p < 0,005$ según el test de Fischer. (b) Ejemplos representativos de tinción de Sirt1 en muestras humanas de carcinoma de tiroides o de tiroides normal del mismo paciente (las muestras de arriba corresponden a los mismos pacientes que las de abajo). Las barras indican 200 μm .

A continuación, quisimos explorar a nivel molecular cuál puede ser el mecanismo por el cual Sirt1 coopera con la deficiencia de PTEN. Primero, y siguiendo el resultado obtenido en el GTT, tratamos MEFs de los distintos genotipos con insulina, así como con EGF o LPA, para intentar ver un efecto diferencial en la activación de AKT, sin embargo, no pudimos constatar diferencia alguna (**Figuras 35a, 35b y 35c**). Asimismo, realizamos un experimento de formación de focos en MEFs tras infección con los oncogenes virales E6 y middleT que, por datos generados en el laboratorio de Manuel Serrano, sabemos que es altamente

dependiente del número de copias y status de PTEN. No obstante, seguimos sin poder apreciar diferencias entre los distintos genotipos (**Figura 35d**).

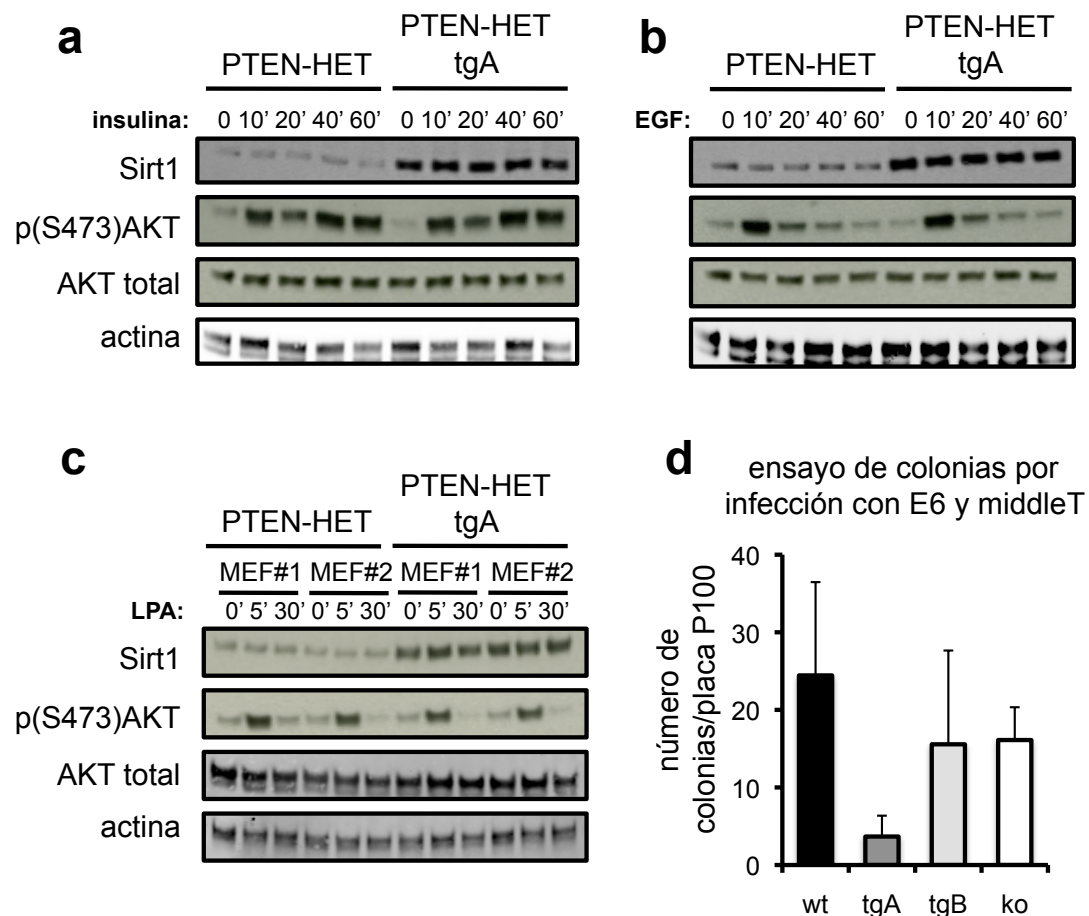


Figura 35. Ensayos de actividad de PTEN en MEFs. (a) Tratamiento de MEFs PTEN-HET o PTEN-HET/tgA con insulina durante distintos tiempos. (b) Tratamiento de MEFs PTEN-HET o PTEN-HET/tgA con EGF durante distintos tiempos. (c) Tratamiento de MEFs PTEN-HET o PTEN-HET/tgA con LPA a distintos tiempos. (d) Ensayo de formación de colonias en MEFs (n=3 por genotipo) wt, tgA, tgB o Sirt1-KO tras infección con los oncogenes E6 y middleT. El test de la t de Student no mostró diferencias significativas respecto al wt ($p>0,15$ en todos los casos).

Los datos obtenidos anteriormente sugieren que, con alta probabilidad, los MEFs no sean el mejor sistema para estudiar la cooperación entre Sirt1 y PTEN, por lo que decidimos utilizar líneas celulares tiroideas para seguir explorando dicho efecto. Para ello, utilizamos las líneas WRO-1 (de cáncer tiroideo folicular) y FRO-1 (de cáncer tiroideo papilar), amablemente cedidas por la Dra. Pilar Santisteban. Dichas líneas son muy refractarias a los procesos de transfección, así que empezamos nuestros estudios tratando dichas células con salermida, un conocido inhibidor de la actividad de Sirt1 (Lara *et al.*, 2009), así como con un siRNA dirigido específicamente contra Sirt1. Así, el tratamiento con salermida a las diferentes dosis probadas demostró que impide eficazmente el crecimiento de ambas líneas celulares (**Figura 36a**). De forma paralela, el tratamiento con el siRNA contra Sirt1 produjo un ligero aunque reproducible descenso en los niveles de p(S473)AKT en la línea WRO-1, que es la proveniente de carcinoma folicular (similar, por tanto, a los

carcinomas que nosotros observamos *in vivo* en los ratones), mientras que por el contrario no conseguimos observar dicho efecto en la línea FRO-1 proveniente de carcinoma papilar (**Figura 36b**). Estudiando más en concreto la línea WRO-1, a nivel de qRT-PCR, observamos que el tratamiento con el siRNA producía un descenso reproducible en los niveles de PDK1 (en sus dos formas) así como de Ku70, y ambas se han implicado en la fosforilación y activación de AKT (Bozulic and Hemmings, 2009; Manning and Cantley, 2007), mientras que no conseguimos observar diferencias en los niveles de PHLPP, que es la principal fosfatasa de AKT

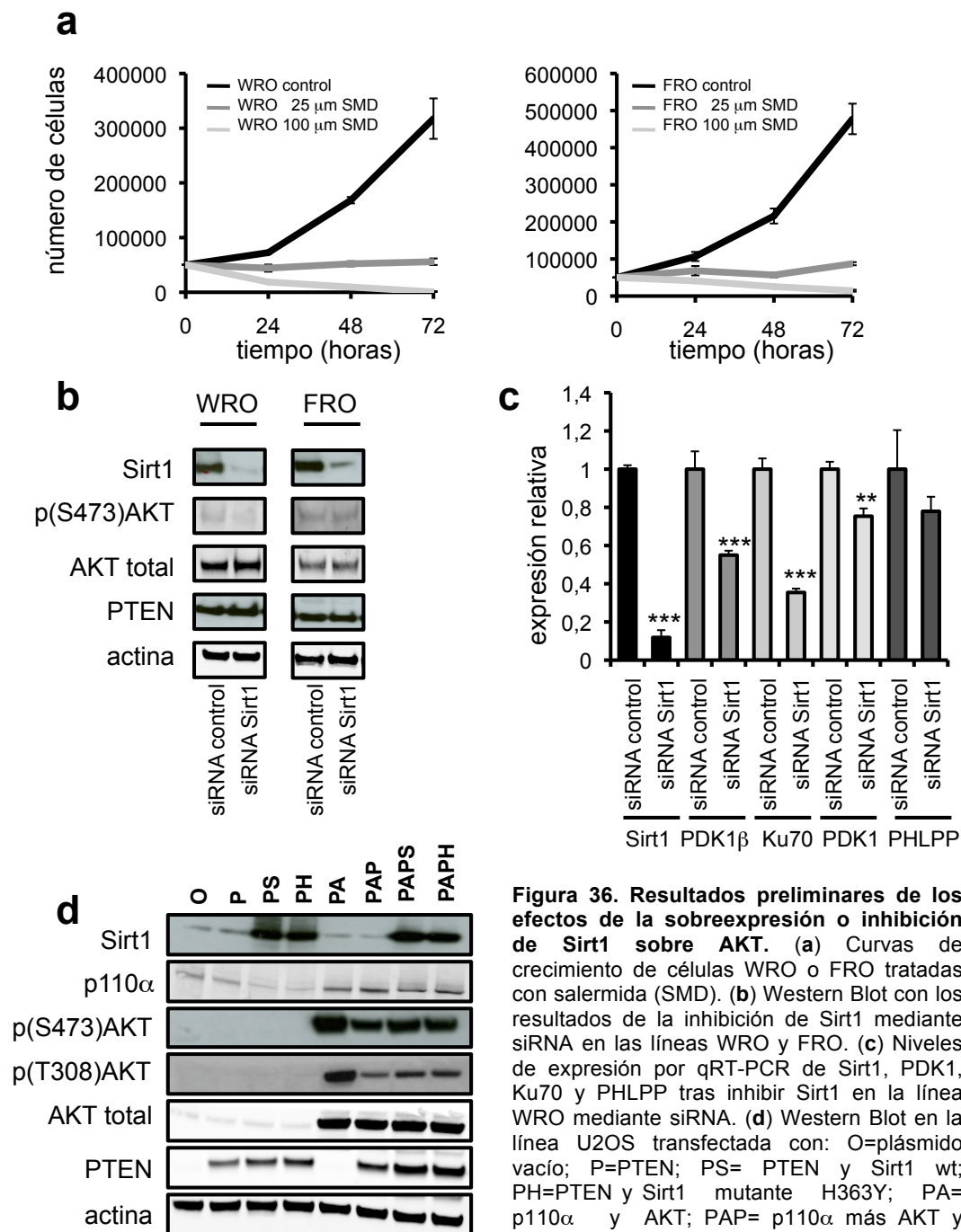


Figura 36. Resultados preliminares de los efectos de la sobreexpresión o inhibición de Sirt1 sobre AKT. (a) Curvas de crecimiento de células WRO o FRO tratadas con salermida (SMD). (b) Western Blot con los resultados de la inhibición de Sirt1 mediante siRNA en las líneas WRO y FRO. (c) Niveles de expresión por qRT-PCR de Sirt1, PDK1, Ku70 y PHLPP tras inhibir Sirt1 en la línea WRO mediante siRNA. (d) Western Blot en la línea U2OS transfectada con: O=plásmido vacío; P=PTEN; PS= PTEN y Sirt1 wt; PH=PTEN y Sirt1 mutante H363Y; PA= p110 α y AKT; PAP= p110 α más AKT y PTEN; PAPS= p110 α más AKT más PTEN más Sirt1 wt; PAPH=p110 α más AKT más PTEN más Sirt1 mutante H363Y.

(Figura 36c). Estos datos podrían darnos una indicación del mecanismo por el que Sirt1 podría estar afectando a los niveles de fosforilación de AKT.

Por otra parte, a pesar de que estas líneas son refractarias a la transfección, como hemos comentado previamente, hicimos experimentos de transfección en otra línea celular más fácil de manipular, como son las células de osteosarcoma U2OS. Así, al reconstituir la vía y sobreexpresar simultáneamente p110 α , AKT y PTEN, junto con plásmido vacío o junto con Sirt1, tanto en su forma wt como en la forma con la mutación H363Y, que provoca la pérdida de la actividad deacetilasa, observamos que la sobreexpresión de Sirt1 producía un aumento concomitante de los niveles de pAKT, tanto de la forma S473 como de la T308 (Figura 36d)

Todos estos experimentos en células han sido obtenidos recientemente, por lo que hace falta confirmar los efectos vistos (explorar la proliferación con el tratamiento con siRNA y también explorar los niveles de pAKT al tratar con salermida) y profundizar en la posible implicación tanto de PDK1 como de Ku70, para intentar así discernir el mecanismo por el cual Sirt1 está afectando a AKT, con el consiguiente efecto oncogénico en el carcinoma tiroideo. Además, paralelamente, estamos intentando explorar el potencial antitumoral *in vivo* de la salermida inyectando dicho compuesto en ratones PTEN-het, para comprobar si es capaz de parar o retrasar el desarrollo de los carcinomas.

IV.2.3. Ratones Sirt1-tg/KRas^{V12}

El último modelo de carcinogénesis genética que hemos analizado es el de la generación de adenocarcinomas de pulmón inducidos por el oncogén constitutivamente activado KRas^{V12}, utilizando un modelo generado por el laboratorio del Dr. Mariano Barbacid. Nos interesamos por investigar el papel de Sirt1 en el cáncer de pulmón debido a estudios publicados durante la realización de la presente Tesis Doctoral, en los que demostraban que Sirt1 es capaz de deacetilar y activar a LKB1 (Hou *et al.*, 2008; Lan *et al.*, 2008). LKB1 es un potente supresor tumoral, cuya haploinsuficiencia provoca la aparición del Síndrome de Peutz-Jeghers, que se caracteriza por la aparición de hamartomas intestinales y por un aumento en la incidencia de cánceres epiteliales (Bardeesy *et al.*, 2002). Además, se han detectado mutaciones somáticas inactivantes de LKB1 en muestras humanas de adenocarcinomas primarios de pulmón, así como en líneas celulares derivadas de ellos (Avizienyte *et al.*, 1999; Carretero *et al.*, 2004; Sanchez-Cespedes *et al.*, 2002). Más aún, se ha visto en modelos de ratón que la deficiencia de LKB1 coopera con el oncogén KRas^{V12} en la formación de adenocarcinomas de pulmón (Ji *et al.*, 2007).

Por otra parte, otros datos obtenidos en el laboratorio de Manuel Serrano durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, sugieren que Notch1 juega un papel oncogénico en este modelo de carcinogénesis, ya que Notch1 promueve la proliferación de las células madre bronco-alveolares, que a su vez favorece la aparición de los tumores, y existen también artículos previos que sugieren que Sirt1 inhibe a Hes1, una de las principales dianas de Notch1 (Hisahara *et al.*, 2008; Prozorovski *et al.*, 2008). Más aún, estudios recientes han implicado también a NFκB en la progresión de este tipo de tumores (Meylan *et al.*, 2009), por lo que la inhibición que ejerce Sirt1 sobre NFκB podría contribuir nuevamente al efecto final en la generación de este tipo de tumores. Todo ello nos llevó a conjeturar que Sirt1 podría jugar un papel protector frente al desarrollo de adenocarcinomas de pulmón por el oncogén KRas^{V12} por alguna de estas vías o por la actuación conjunta sobre varias de ellas.

El modelo LSLG12Vgeo(+/-G12Vgeo):RERTn(ert/ert) (o simplemente KRas^{V12} a partir de ahora, para una mayor concisión) ha sido caracterizado previamente por el laboratorio del Dr. Mariano Barbacid (Guerra *et al.*, 2003). Este modelo presenta un alelo inducible *knock-in* del oncogén constitutivamente activado KRas^{V12}. De manera resumida, presenta varias secuencias inhibidoras de la transcripción (STOP) en serie, flanqueados por dos sitios loxP en el primer intrón; una mutación G12V en el

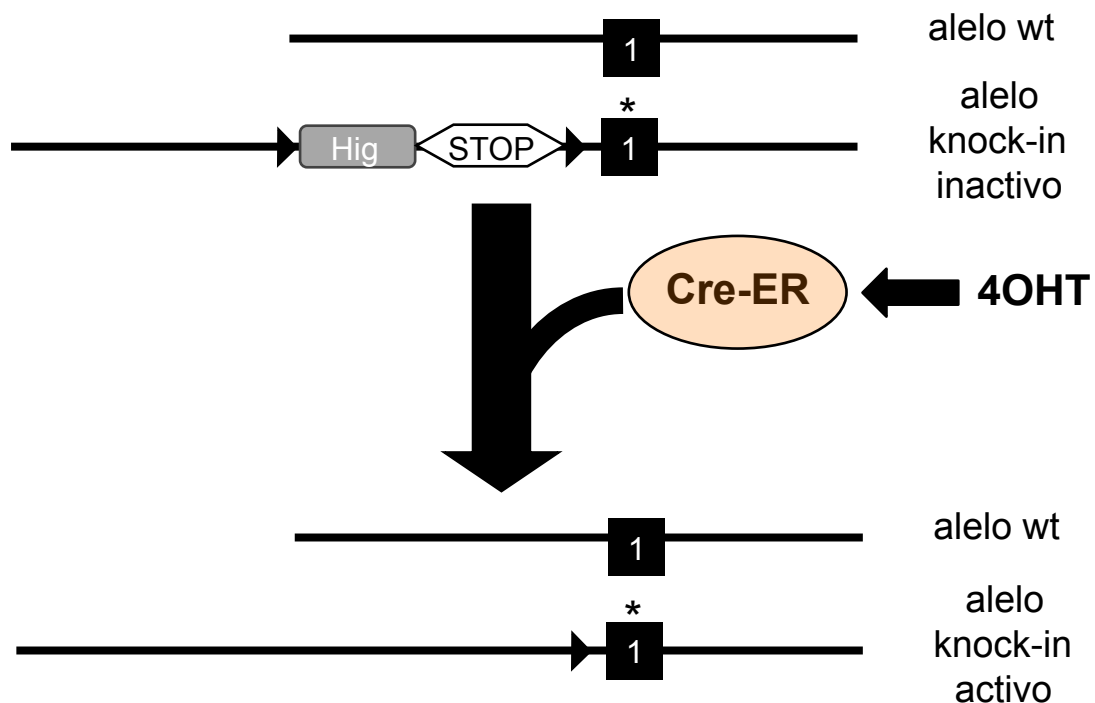


Figura 37. Estrategia de activación del oncogén KRas^{V12}. En ausencia de 4OHT, el ratón expresa solamente el alelo wt de KRas, manteniéndose silenciado el alelo knock-in pero, al añadir el 4OHT, la recombinasa Cre se activa y puede escindir las secuencias loxP, de forma que se empieza a expresar el oncogén KRas^{V12}; caja negra: exón 1 codificante; Hig: cassette PGK-higromicina; STOP: secuencia inhibidora de la transcripción; triángulos: sitios loxP; *: mutación oncogénica en el codón 12 y secuencia IRES-LacZ a continuación.

primer exón, que confiere a la proteína una actividad constitutiva al bloquear su actividad GTPasa; y un gen de expresión LacZ en el extremo 3' del ORF acoplado a KRas por una secuencia IRES. En conjunto, este modelo de ratón presenta un alelo que no expresa KRas (tiene secuencias STOP en el primer intrón) salvo cuando se activa la enzima Cre, que escinde la secuencia entre los sitios loxP, es decir, elimina las secuencias STOP. En este momento aparece un mutante constitutivamente activo de KRas (KRas^{V12}) y, en el mismo transcrito, una secuencia que codifica LacZ, que podemos usar como marcador de activación del oncogén. Este modelo sólo presenta un alelo mutante, ya que la pérdida de KRas es letal en homocigosis. Para conseguir la escisión de las secuencias STOP en el momento deseado, los animales KRas^{V12} expresan la proteína híbrida Cre-ER de manera constitutiva al estar acoplada al gen de la RNA polimerasa II con un elemento IRES. Este híbrido permanece retenido en el citoplasma e inactivo en una situación normal pero, al añadirse 4-hidroxitamoxifeno (4OHT), el dominio de receptor de estrógeno se activa y permite la translocación del híbrido al núcleo, donde el dominio Cre ya es capaz de escindir las secuencias genómicas con las secuencias STOP localizadas entre los dos sitios loxP, permitiendo así la transcripción del alelo constitutivamente activo de KRas^{V12}. Así, sólo al administrar 4OHT se activará el oncogén KRas^{V12}, mientras que en ausencia de dicho tratamiento, el ratón tendrá un alelo wt de KRas y otro silenciado, como se representa de forma resumida en la **Figura 37**.

Por todo ello, decidimos cruzar los ratones Sirt1-tgA con animales KRas^{V12} para obtener animales heterocigotos para los alelos Sirt1-tgA, KRas^{V12} y RERT y, sobre ellos, activamos el oncogén KRas^{V12} tras la administración intraperitoneal de 4OHT.

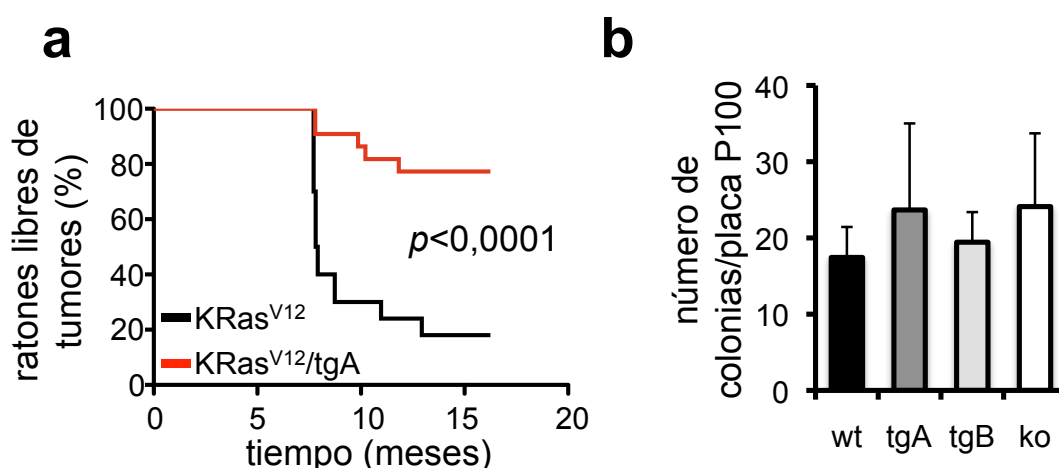


Figura 38. Sirt1 protege del desarrollo de adenocarcinomas dirigidos por el oncogén KRas^{V12}. (a) La sobreexpresión de Sirt1 retrasa eficazmente el desarrollo de adenocarcinomas de pulmón inducidos por KRas^{V12}. La aparición de los tumores se monitorizó mediante microCT ($n \geq 19$ por genotipo), y la significancia estadística se determinó mediante el Logrank test. (b) Ensayo de formación de colonias en MEFs ($n=3$ por genotipo) wt, tgA, tgB o Sirt1-KO tras infección con los oncogenes E6 y H-Ras. El test de la t de Student no mostró diferencias significativas respecto al wt.

Así, seguimos los ratones wt para Sirt1 frente a los que presentaban el tgA por microCT, y comprobamos que el alelo extra de Sirt1 confiere una protección muy eficaz frente al desarrollo de estos adenocarcinomas (**Figura 38a**).

Aunque este estudio se encuentra en una fase muy inicial, este dato alentador nos llevó a investigar *in vitro* en MEFs wt o tgA si la infección conjunta con los oncogenes E6 y H-Ras^{V12} producía una generación de focos diferencial entre ambos genotipos aunque, como ocurría en el caso de E6 y middleT (**Figura 35d**), no pudimos apreciar diferencia alguna (**Figura 38b**). Esto nos lleva nuevamente a especular que los MEFs no son, probablemente, el mejor sistema para ver la protección de Sirt1 frente a KRas^{V12}, y nos llevará a investigar el mecanismo en profundidad en líneas celulares de adenocarcinomas o en otros sistemas alternativos.

En cualquier caso, y a pesar del status ciertamente preliminar de los resultados obtenidos, Sirt1 parece ejercer un potente efecto supresor sobre la generación de adenocarcinomas de pulmón *in vivo*.

Discusión

En el presente trabajo, hemos generado y caracterizado nuevos modelos de ratón que sobreexpresan Sirt1 de forma moderada (≈ 3 veces) y homogénea a lo largo de los distintos tejidos del organismo, de forma que constituyen un modelo de intervención farmacológica dirigido selectivamente a aumentar los niveles de Sirt1. Previamente al desarrollo de esta Tesis Doctoral, se habían publicado numerosos estudios ligando la proteína Sir2 con los procesos de metabolismo y envejecimiento en organismos modelo. Ahora, con los modelos generados en este trabajo, hemos conseguido profundizar en el conocimiento del impacto de Sirt1 sobre los procesos de metabolismo, envejecimiento y cáncer específicamente en mamíferos, como exponemos en la siguiente discusión.

I. Sirt1 y metabolismo

Los datos generados durante el desarrollo de la presente tesis nos permiten afirmar que Sirt1 juega un papel protector frente al daño metabólico inducido por dietas ricas en grasa. La sobreexpresión moderada (≈ 3 veces) y regulada de forma endógena protege del desarrollo de esteatosis hepática, mejorando a nivel hepático la tolerancia a la glucosa y disminuyendo la resistencia hepática a la insulina cuando el organismo se enfrenta a dietas ricas en grasa. En nuestras manos, el mecanismo de protección se debe, al menos, a la acción de Sirt1 sobre 2 rutas distintas: en primer lugar, por los efectos inhibitorios de Sirt1 sobre la vía de NF κ B y la inflamación sistémica y, en segundo lugar, por la activación de la ruta de PGC1 α con el consiguiente aumento en la expresión de proteínas antioxidantes.

La ruta de señalización de NF κ B se activa en el hígado tras el tratamiento con HFD y provoca la resistencia a la insulina (Cai *et al.*, 2005), de forma que se establece así el nexo de unión entre la inflamación y el desarrollo de resistencia a la insulina asociado a la obesidad (Arkan *et al.*, 2005). En nuestros ratones, los ensayos *in vitro* (**Figura 16**) e *in vivo* (**Figuras 11d, 16d y 18**) muestran que Sirt1 es capaz de deacetilar a p65-RelA, de forma que inhibe su actividad y se aminora la inflamación observada a nivel hepático (**Figura 16a**). Y, más aún, dicha protección se refleja también en una menor infiltración de macrófagos en la grasa (**Figura 18a**), que es otro factor determinante en la generación de señales inflamatorias que conducen a la resistencia a la insulina y, aunque se desconoce por el momento la causa por la cual son reclutados los macrófagos al tejido adiposo (Taubes, 2009), el hecho de que Sirt1 sea capaz de frenar dicha infiltración ofrece nuevas y excitantes posibilidades en la investigación dirigida a frenar dicho fenómeno.

Por su parte, PGC1 α es una de las dianas mejor estudiadas de Sirt1 (Canto and Auwerx, 2009) y es capaz de activar la respuesta transcripcional protectora frente al estrés oxidativo (St-Pierre *et al.*, 2006). A su vez, el estrés oxidativo es otra de las causas del desarrollo de esteatosis hepática (Matsuzawa *et al.*, 2007) de forma que, por ejemplo, los ratones deficientes en la proteína antioxidante Nrf1 (Xu *et al.*, 2005) desarrollan esteatosis hepática y, consistente con la activación de PGC1 α por Sirt1, nuestros ratones presentan mayores niveles tanto de Nrf1 como de MnSOD en hígado (**Figura 17**).

Así, ambos efectos confluyen confiriendo protección frente a la inflamación hepática, que es un conocido factor de riesgo para el desarrollo de resistencia hepática a la acción de la insulina (Shoelson *et al.*, 2007). Ésta, a su vez, puede promover la progresión a hepatoesteatosis (Ota *et al.*, 2007), de forma que se establece el círculo vicioso que parece jugar un papel fundamental en el desarrollo del síndrome metabólico (**Figura 39**).

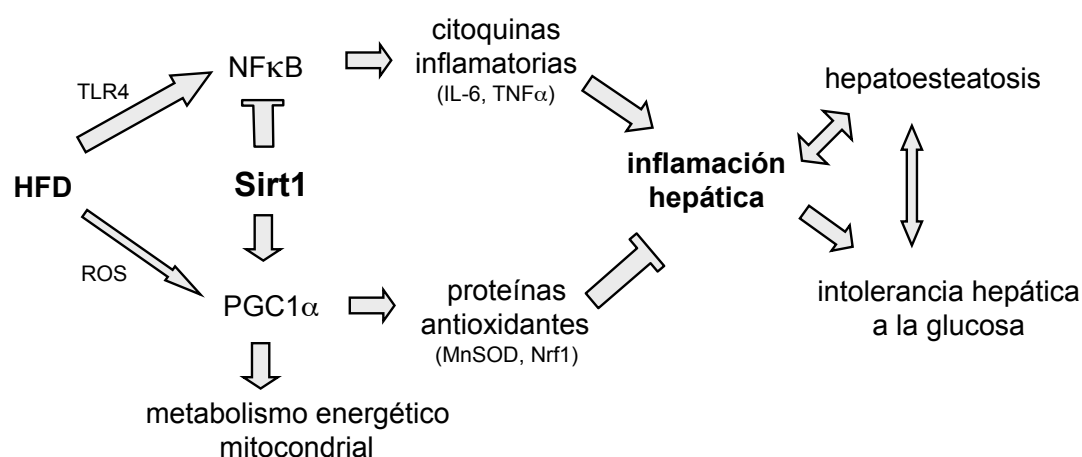


Figura 39. Modelo de los efectos de Sirt1 sobre las rutas moleculares que conectan las grasas alimentarias con la hepatoesteatosis y la intolerancia a la glucosa.

De forma previa, varios estudios habían atribuido un papel importante para Sirt1 en la secreción de la insulina (Bordone *et al.*, 2007; Moynihan *et al.*, 2005), de forma que Sirt1 promovía la liberación de la misma. Sin embargo, en nuestro modelo *in vivo* no hemos conseguido observar dicho aumento en su liberación, de forma que los ratones transgénicos presentan unos niveles de insulina similares a los ratones wt ya sean tratados con SD o con HFD (**Tabla 2**). Aquí hay que resaltar que el estudio en el que demostraban *in vivo* dicho efecto utilizaron ratones transgénicos que sobreexpresaban Sirt1 específicamente en las células β del páncreas, y bajo el control del promotor de la insulina, de forma que observaban aumentos de más de 12 veces en los niveles de Sirt1 (Moynihan *et al.*, 2005). Esta estrategia hace que la proteína sobreexpresada no esté bajo la regulación endógena de Sirt1 y, además,

provoca una sobreexpresión mucho mayor a la conseguida en nuestros ratones, en los que los niveles obtenidos son más fisiológicos. Esto puede explicar las diferencias entre estudios y, más aún, lo hace compatible con el hecho de que una sobreexpresión de Sirt1 hasta unos niveles verdaderamente tan elevados sí que pueda tener un efecto directo en la liberación de la insulina.

Conviene ahora añadir y comentar otros resultados publicados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral y que, de forma mayoritaria, refuerzan los efectos observados por nosotros. Así, el tratamiento de los ratones con activadores de Sirt1, ya sea el resveratrol (Baur *et al.*, 2006; Lagouge *et al.*, 2006) u otros activadores sintéticos de nueva generación y más potentes (Feige *et al.*, 2008; Milne *et al.*, 2007), protege del desarrollo de esteatosis así como de la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina asociados a HFD. Adicionalmente, otro grupo independiente de investigadores generó un animal transgénico para Sirt1 mediante un protocolo muy similar al nuestro, y con un BAC muy parecido a nuestro tgB. Interesantemente, aunque no investigaron el desarrollo de esteatosis hepática, dicho estudio llegó a conclusiones muy similares a las nuestras, observando una mayor tolerancia hepática a la glucosa y una protección en general frente al desarrollo de *diabetes mellitus* tipo II, ya fuera utilizando HFD o cruzando sus transgénicos con los ratones db/db, que desarrollan diabetes por una mutación hereditaria en el gen del receptor de leptina (Banks *et al.*, 2008). Sin embargo, dicho grupo llegó a unas conclusiones distintas en cuanto al metabolismo basal de sus ratones y en cuanto al mecanismo de protección hepática. Sus ratones presentan un incremento del 30% en los niveles de adiponectina, así como un descenso en el consumo de O₂, en la ingesta de comida y en la actividad locomotora en estado basal. A nivel mecanístico, proponen que la sobreexpresión de Sirt1 produce una mayor deacetilación y activación de FoxO1, que a su vez produce el aumento de adiponectina, y este aumento de adiponectina puede ser suficiente para explicar el aumento de sensibilidad hepática a la insulina (Combs *et al.*, 2001).

Nosotros intentamos reproducir en nuestros ratones el observado aumento en la deacetilación de FoxO1 pero, en nuestras manos, los anticuerpos utilizados (los mismos que en dicho trabajo) para su detección no ofrecían resultados fiables y no pudimos constatar dicho efecto, aunque no podemos descartar que pueda jugar un papel importante. Más aún, nuestros ratones no presentan un aumento en los niveles basales de adiponectina (**Tabla 2**), mientras que ellos no observan diferencias en cuanto a la inflamación sistémica. Aunque sus datos son muy convincentes, una posible explicación de estas diferencias podría ser que su transgén, al insertarse, hubiera afectado a otro gen implicado en la secreción de la

adiponectina, puesto que no presentan otra línea adicional de transgénicos para descartar dicho efecto. Otra diferencia entre ambos estudios y que puede condicionar parte de los resultados obtenidos es el tipo específico de dietas usadas. En su caso, no hacen referencia a qué SD utilizan, pero en la HFD que emplean ellos, el 60% de la energía proviene de la grasa, mientras que en nuestro caso se limita a un 45%. Por otra parte, conviene resaltar ahora que, de forma simultánea a la escritura de la presente Tesis Doctoral, grupos adicionales de investigadores publicaron estudios que refuerzan aun más los datos obtenidos por nosotros. Así, los ratones heterocigotos para Sirt1 son más sensibles al desarrollo esteatosis inducida por HFD (Xu *et al.*, 2010); por otra parte, los ratones deficientes en DBC1 (un regulador negativo de Sirt1) presentan básicamente el mismo fenotipo metabólico que el observado en nuestros ratones (Escande *et al.*, 2010) y, a nivel mecanístico, ambos trabajos atribuyen los fenotipos observados a los efectos de los distintos niveles de Sirt1 sobre la inflamación sistémica, de forma que observan menor inflamación cuanto mayores son los niveles de Sirt1.

A pesar de los puntos de discrepancia entre los distintos estudios, lo más importante es la conclusión global compartida entre ellos en cuanto a la protección que confiere Sirt1 frente a la intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina a nivel hepático, lo que posiblemente se puede traducir en una protección frente al desarrollo de *diabetes mellitus* tipo II. En este sentido, los estudios con activadores específicos de Sirt1 (Milne *et al.*, 2007) dan mucha fuerza a esta idea y, aunque trabajos más recientes cuestionan la verdadera capacidad de dichos compuestos para activar directamente a Sirt1 (Pacholec *et al.*, 2010), también cabe la posibilidad de que el resveratrol y el resto de activadores actúen de manera indirecta sobre Sirt1, a través de la activación de AMPK (Canto *et al.*, 2009; Canto *et al.*, 2010). En cualquier caso, no cabe duda que la búsqueda de fármacos potentes capaces de activar a Sirt1 de forma específica va a convertirse en los años venideros en una vía adicional para abordar el tratamiento de la *diabetes mellitus* tipo II. En este sentido, es muy tentador especular que dichos activadores podrían convertirse en una terapia ideal en los casos en los que la patología estuviera más restringida a la pérdida de respuesta hepática a la insulina y, asimismo, podrían utilizarse en combinación con fármacos que potencian la liberación de la insulina, como las sulfonilureas, o con fármacos que aumentan la sensibilidad de los tejidos periféricos a la acción de la insulina como la metformina, para intentar obtener de esta forma un efecto beneficioso sinérgico.

II. Sirt1 y envejecimiento

En cuanto a su efecto en la longevidad, es necesario recordar los estudios publicados previamente al comienzo de nuestro trabajo. Así, estudios genéticos en los que se deleccionaba o se sobreexpresaba Sir2 en *S. cerevisiae* (Kaeberlein *et al.*, 1999) demostraron que Sir2 era un factor limitante para la longevidad de las levaduras, de tal forma que las levaduras con delección de Sir2 vivían aproximadamente un 50% menos que las levaduras wild-type, mientras que las que sobreexpresaban Sir2 llegaban a vivir hasta un 30% más. De forma similar, la sobreexpresión de Sir2 en *C. elegans* (Tissenbaum and Guarente, 2001) o *D. melanogaster* (Rogina and Helfand, 2004) proporcionaba un aumento en la longevidad de hasta el 60%. Asimismo, se demostró que Sir2 era absolutamente imprescindible para que la restricción calórica (CR) confiriese un aumento en la longevidad (Lin *et al.*, 2000; Rogina and Helfand, 2004) y, paralelamente, se demostró que compuestos naturales activadores de Sir2 eran capaces de recapitular dichos efectos (Wood *et al.*, 2004). En cuanto a mamíferos, se había conseguido generar un ratón KO para Sirt1 (Cheng *et al.*, 2003; McBurney *et al.*, 2003) que presentaba mortalidad perinatal, lo que limitaba el estudio de su envejecimiento, sin embargo, los pocos ratones que sobrevivían parecían no responder completamente a la CR (Chen *et al.*, 2005).

Todos estos datos provocaron unas expectativas elevadas en cuanto al potencial de Sirt1 para luchar contra el envejecimiento también en mamíferos. Por ello, llevamos a cabo ambiciosos estudios para determinar el impacto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre el envejecimiento en nuestros ratones. Sin embargo, las dos líneas independientes de ratones transgénicos para Sirt1 presentaron curvas de supervivencia indistinguibles de las mostradas por sus propios controles wt (**Figura 19**), aunque es razonable especular que la falta de efecto de Sirt1 sobre el desarrollo de linfomas (**Figura 20b**) podría estar oscureciendo en nuestras líneas un posible efecto en la longevidad. No obstante, quisimos hacer un seguimiento completo de ambas líneas de transgénicos durante el proceso de envejecimiento, y no quedarnos únicamente con los resultados de sus curvas de supervivencia. Así, hemos podido comprobar que los ratones que sobreexpresan Sirt1 presentan una mayor tolerancia a la glucosa aún con SD, así como una mayor densidad ósea, al envejecer. Ambos resultados indican que nuestros ratones presentan cierto nivel de protección frente al desarrollo de *diabetes mellitus* tipo II y de osteoporosis (**Figuras 21 y 22**), dos de las enfermedades más frecuentemente asociadas al envejecimiento. Además, los ratones transgénicos presentan una menor incidencia

de desarrollo espontáneo de cáncer (punto que analizaremos más en detalle en la sección III de la presente Discusión) y una mejor capacidad regenerativa de la piel. Todos estos datos fisiológicos se vieron reforzados a nivel molecular por un menor aumento de los niveles de mRNA de p16^{Ink4a}, así como de una menor acumulación de células con daño en el ADN en el hígado (**Figura 24**), siendo ambos marcadores los más comúnmente aumentados durante el proceso de envejecimiento en los mamíferos. En conjunto, estos resultados nos permiten proponer que la sobreexpresión de Sirt1 promueve un envejecimiento “más saludable” en nuestros ratones, aún sin conseguir ver efectos sobre la supervivencia final.

En este sentido, es necesario comentar aquí los resultados generados por un grupo independiente de investigadores durante el desarrollo de esta tesis, en el que comprobaron los efectos del tratamiento crónico de los ratones con el resveratrol (Pearson *et al.*, 2008). En dicho estudio, los investigadores observaron que, de forma similar a lo ocurrido en nuestro caso con la sobreexpresión de Sirt1, el tratamiento crónico con resveratrol era capaz de retrasar el deterioro fisiológico inherente al envejecimiento sin, por el contrario, conseguir incrementar la supervivencia de los ratones. Así, de forma similar a lo observado por nosotros, dichos ratones presentan menor osteoporosis y mayor coordinación neuromuscular, entre otros fenotipos, mientras que con el tratamiento con resveratrol no se consigue ver un efecto a nivel de desarrollo espontáneo de cáncer, como sí ocurre en nuestro caso con la sobreexpresión genética de Sirt1.

Teniendo en cuenta ambos estudios, podemos concluir que Sirt1 ejerce un verdadero efecto beneficioso sobre el envejecimiento. Asumiendo esta idea, es razonable especular que una sobreexpresión de Sirt1 mayor a la conseguida en nuestros ratones y/o el tratamiento con activadores más potentes que el resveratrol, podrían finalmente provocar un aumento de la supervivencia en los ratones. Sin embargo, el hecho de no ver un efecto en supervivencia con la mera sobreexpresión de Sirt1 cuando sí se ha observado en organismos modelo, que curiosamente sólo presentan una única sirtuína, también puede reflejar el hecho de que en mamíferos sea necesario actuar sobre varias o todas las sirtuínas simultáneamente para conseguir recapitular de forma total los efectos observados con la restricción calórica y, en particular, el alargamiento de la vida. Más aún, el resultado obtenido al cruzar los ratones Sirt1-tg con ratones p53-KO, en los que no observamos el retraso esperado en la aparición de los tumores, ni observamos un efecto sinérgico en un protocolo con ayuno intermitente (**Figura 29a**), nos lleva a especular que Sirt1 no sea el único mediador de los efectos de la restricción calórica en mamíferos y que, posiblemente, no sea el más importante de ellos.

En este sentido, se necesitan estudios de envejecimiento adicionales en modelos de sobreexpresión del resto de las sirtuínas para discernir si alguna de ellas *per se* puede provocar aumento en la supervivencia, así como en modelos conjuntos de varias de ellas. Así, por ejemplo, hemos establecido una colaboración con el Dr. Haim Cohen (Universidad Bar-Ilan, Israel) para determinar el efecto conjunto de la sobreexpresión de Sirt1 y Sirt6, otra sirtuína que se ha asociado a envejecimiento (Mostoslavsky *et al.*, 2006) y metabolismo (Kanfi *et al.*, 2009).

Con toda probabilidad, los años venideros serán claves para arrojar luz sobre los efectos de las distintas sirtuínas en el envejecimiento de los mamíferos.

III. Sirt1 y cáncer

Por último, hace falta resaltar los distintos efectos que puede provocar la proteína Sirt1, y su sobreexpresión, sobre el desarrollo de procesos cancerígenos. Previamente al presente estudio, los pocos datos que se tenían ligando a Sirt1 con el cáncer provenían de estudios realizados *in vitro*, en los que se sugería un probable rol oncogénico para Sirt1, debido a su impacto inhibitorio sobre el supresor tumoral p53 (Luo *et al.*, 2001; Vaziri *et al.*, 2001), mientras que no se conocía nada de su papel *in vivo*. Así, y siendo el laboratorio de Manuel Serrano un laboratorio centrado especialmente en cáncer y supresores tumorales, quisimos profundizar en dicha relación a nivel fisiológico, habiendo obtenido hasta el momento multitud de resultados que, sin embargo, no permiten otorgar a Sirt1 un papel clásico como supresor tumoral o como oncogén.

III.1. Sirt1 y cáncer espontáneo

Así, el primer y más importante efecto que tenemos que comentar es que la sobreexpresión de Sirt1, de la misma forma que protege de otras enfermedades típicamente asociadas al envejecimiento como hemos observado con anterioridad, protege asimismo del desarrollo espontáneo de cáncer durante el proceso de envejecimiento (**Figura 20**). El hecho de que proteja del desarrollo de tumores pero, sin embargo, no se vea reflejado en un aumento de la supervivencia puede resultar algo paradójico. No obstante, dicha observación no es del todo sorprendente puesto que al analizar el espectro de los tumores, observamos que el desarrollo de linfomas no se ve afectado, sino que Sirt1 protege del desarrollo de carcinomas y sarcomas

específicamente. La mayor parte de los linfomas son altamente agresivos y, en general, son causa de muerte para el ratón. Por el contrario, los carcinomas y sarcomas se encontraron generalmente en órganos no vitales y fueron en general de pequeño tamaño y sin diseminar, por lo que es concebible que dichos tumores no constituyeran la causa principal de muerte. Más aun, un estudio previo realizado en nuestro laboratorio en el que se analiza la sobreexpresión de un supresor tumoral prototípico como p53 demostró que, si bien los ratones desarrollan menos cáncer de forma espontánea, esto no se traduce tampoco en un aumento de la supervivencia (Garcia-Cao *et al.*, 2002), algo similar a lo que ocurre al sobreexpresar p19ARF (Matheu *et al.*, 2004), y sólo al sobreexpresar ambas proteínas simultáneamente, lo que provoca que los ratones sean prácticamente refractarios al desarrollo de tumores, se observa un aumento en la supervivencia (Matheu *et al.*, 2007).

Otro hecho paradójico que es necesario comentar en este punto es que, a la vez que se generaron los datos presentados en esta tesis, varios laboratorios independientes postularon un papel supresor de tumores *in vivo* para Sirt1, y en particular, en el desarrollo de linfomas (Oberdoerffer *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Esto contrasta con la falta de efecto observada en nuestro caso a nivel de linfomas espontáneos, sin embargo, ambos estudios realizan sus observaciones en un fondo de alta inestabilidad genómica como es el fondo p53 heterocigoto, y uno de ellos incluso utiliza radiación ionizante concomitante (Oberdoerffer *et al.*, 2008). Esto hace que dichos linfomas sean sumamente agresivos y se generen en muy pocos meses, de forma que es difícil establecer un paralelismo con lo observado en los linfomas durante el envejecimiento, que se generan en su mayoría a partir del año y medio de vida y, por tanto, es concebible que no dependan tanto del daño agudo en el ADN como los generados en un fondo genético deficiente en p53. Sería muy interesante estudiar el efecto de la radiación ionizante a nivel de generación de linfomas en un fondo wt para p53, de forma que no fuesen tan agresivos, y ver si en ese caso la sobreexpresión de Sirt1 protege de su desarrollo, tal y como cabe esperar dado su papel protector frente al daño al ADN como han descrito dichos estudios, conjuntamente con nuestras observaciones sobre daño al ADN en hígado.

En cuanto al efecto protector observado frente al desarrollo de carcinomas y sarcomas, no observado en el caso de los linfomas, es razonable especular que podría ser un reflejo de la deacetilación e inhibición de β -catenin por Sirt1 (Firestein *et al.*, 2008), puesto que β -catenin es un oncogén que se está asociado, en general, al desarrollo de distintos tipos de cáncer de origen epitelial.

III.2. Sirt1 y carcinogénesis química

El segundo dato que es importante resaltar es el efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre el desarrollo de carcinomas hepáticos en un contexto de síndrome metabólico. Una vez habíamos observado los efectos protectores de Sirt1 frente al daño metabólico, y teniendo en cuenta los datos de cáncer espontáneo que sugerían un papel supresor para Sirt1, quisimos estudiar el efecto de esta proteína en la generación de tumores de hígado asociados a una ingesta elevada de grasas en la dieta, que es un tipo de cáncer muy relevante para la población humana, puesto que el desarrollo de esteatosis hepática puede resultar en muchos casos en la aparición de cirrosis que, a su vez, es el principal factor de riesgo para el desarrollo de carcinomas hepáticos (Powell *et al.*, 2005). Así, desarrollamos un protocolo basado en la inyección del carcinógeno DEN, seguido de alimentación ininterrumpida con HFD. En este contexto, la sobreexpresión de Sirt1 confiere una eficaz protección frente a la aparición de tumores en el hígado (**Figura 25**). Nuestras observaciones indican que dicha protección se debe a un doble mecanismo:

1-. Por un lado, a la protección ya observada con anterioridad frente al daño metabólico asociado a una dieta muy rica en grasas, de forma que los ratones transgénicos están protegidos frente a la esteatosis y la inflamación hepática (**Figuras 14, 16 y 18**), habiendo observado además menor inflamación también en el tejido adiposo (**Figura 18a**), que a su vez es importante también en la generación de resistencia a la acción de la insulina. La inflamación es un factor determinante en la aparición y progresión de los carcinomas iniciados por el DEN (Maeda *et al.*, 2005; Naugler *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2010) de forma que, al disminuir dicha inflamación a través de los mecanismos ya comentados en la sección I de la presente Discusión, Sirt1 confiere protección frente a la aparición de estos carcinomas.

2-. Por otra parte, los experimentos de inyección y exploración a tiempo corto de los efectos del DEN indican que Sirt1 protege asimismo frente al daño inicial promovido por el carcinógeno. Así, los hígados de animales transgénicos presentan menores niveles de células con daño en el ADN, lo que se traduce en menor apoptosis, menores niveles de ALT en sangre y menor proliferación compensatoria (**Figura 26a y 26b**), siendo dicha proliferación lo que se sugiere que conduce, con el paso del tiempo, a la aparición de los carcinomas (Maeda *et al.*, 2005). Más concretamente, Sirt1 responde frente al daño generado por el DEN aumentando su

localización en la cromatina (**Figura 26d**), de forma similar a lo descrito previamente en células ES *in vitro* (Oberdoerffer *et al.*, 2008), y protegiendo así a la célula frente a dicho daño. Este reclutamiento parece ser mediado, al menos en parte, por ATM, ya que los animales ATM-KO presentan unos niveles de Sirt1 asociados a la cromatina muy disminuidos aún al ser tratados con DEN (**Figura 27**).

Ambos mecanismos, por tanto, confluyen proporcionando un alto nivel de protección frente al cáncer hepático asociado a un contexto de síndrome metabólico. Aquí conviene mencionar, por su repercusión en la patología humana, que uno de los estudios que proponían un rol supresor tumoral para Sirt1 encontró que la proteína Sirt1 se encuentra disminuida en un considerable porcentaje de carcinomas hepáticos humanos (Wang *et al.*, 2008). Estos datos hacen tentador especular con que el tratamiento con los activadores de Sirt1, para los que ya hemos discutido un futuro rol en la prevención y en el tratamiento de ciertos tipos de diabetes, pudiera simultáneamente provocar un descenso en la aparición de tumores, de forma similar a lo que se ha descrito previamente en el caso de otro antidiabético como la metformina tanto en estudios en ratón (Huang *et al.*, 2008), como en estudios en humanos (Bowker *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2005).

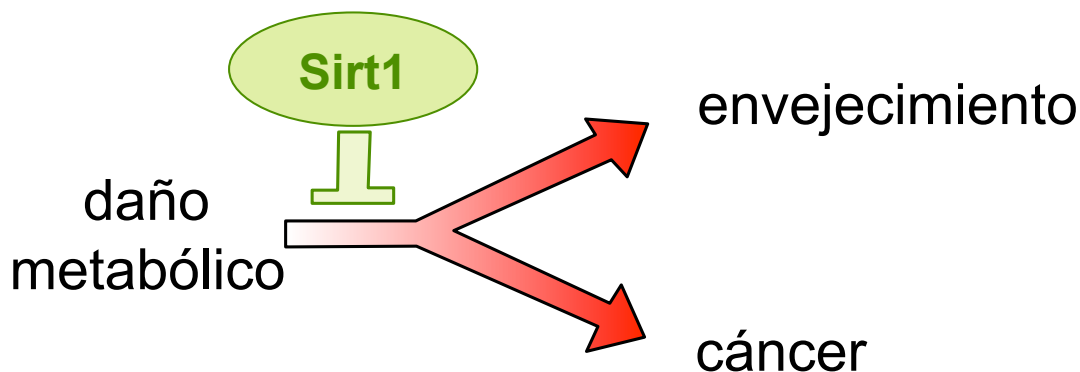


Figura 40. Resumen esquemático del efecto de Sirt1 en metabolismo, envejecimiento y cáncer

No obstante, se necesitan estudios adicionales para investigar el papel preciso de Sirt1 tras unirse a la cromatina. Este Sirt1 asociado al ADN podría previsiblemente provocar cambios epigenéticos en las histonas presentes en dichas porciones genómicas, que podrían a su vez promover el reclutamiento de proteínas implicadas en la reparación. Los resultados en hígado (**Figura 26b**) nos hacen sugerir que Sirt1 probablemente promueve una reparación más eficaz del daño en el ADN, de forma similar a lo sugerido con anterioridad por otros investigadores (Oberdoerffer *et al.*, 2008), pero sería interesante realizar estudios de cinética de reparación en hepatocitos primarios para confirmar y estudiar en profundidad dicha hipótesis, que además contrasta con el resultado en MEFs (**Figura 28b**), así como

con el resultado del experimento de 3MC (**Figura 28a**), que sugieren que las funciones de Sirt1 pueden ser muy diferentes entre distintos tipos celulares.

III.3. Sirt1 y carcinogénesis genética

Además de los ensayos de carcinogénesis química, quisimos también investigar el papel de Sirt1 en otras carcinogénesis dirigidas de forma genética, que es una forma más “limpia” de generar tumores y estudiar el efecto de la sobreexpresión de Sirt1 en los mismos.

En primer lugar, analizamos la sobreexpresión de Sirt1 en un fondo p53-KO y, como ya hemos discutido anteriormente en la sección II de la presente discusión, no observamos ningún retraso en la aparición de los tumores, ni siquiera en un protocolo de ayuno intermitente (**Figura 29**), lo que nos sugiere que Sirt1 es incapaz de frenar un desarrollo de tumores tan rápido y agresivo como el del fondo p53-KO y, además, nos lleva a cuestionar nuevamente la mediación por Sirt1 en mamíferos de los fenotipos asociados a la restricción calórica o, al menos, de una parte de los mismos, ya que la CR retrasa la aparición de tumores en los ratones p53-KO.

En segundo lugar, analizamos el efecto de poner el transgén de Sirt1 en un fondo heterocigoto para PTEN. PTEN es una fosfatasa que regula negativamente la señalización de la insulina y cuya deficiencia se asocia al desarrollo de síndromes linfoproliferativos, feocromocitomas, carcinomas de tiroides y de próstata, y realizamos dicho cruce con la hipótesis en mente de que Sirt1 podría acelerar la carcinogénesis típica de la deficiencia de PTEN, basándonos en los datos generados con anterioridad que indican que Sirt1 mejora la respuesta a la insulina en animales con HFD, así como en estudios en humanos que mostraban una correlación entre la elevada expresión de Sirt1 y el cáncer de próstata (Huffman *et al.*, 2007).

De forma consistente con nuestra hipótesis, los animales doblemente transgénicos presentan una respuesta mejor cuando se les confronta con una elevada dosis de glucosa en un GTT, aun en SD (**Figura 30**). Más aun, al estudiar la supervivencia de dichos animales, observamos que los PTEN-het/tgA mueren significativamente antes que los animales PTEN heterocigotos simples (**Figura 31**). Al analizar histopatológicamente dichos ratones, observamos que hay una clara aceleración en el desarrollo de cáncer de tiroides y de próstata en los animales dobles (**Figuras 31b y 31c**), siendo el desarrollo de cáncer de tiroides el responsable de la aceleración en la muerte, debido a la compresión que se genera

sobre la traquea que, con el tiempo, impide a los ratones respirar con normalidad. A nivel molecular, los tiroides pre-neoplásicos de ratones jóvenes con 2 meses de edad, presentan mayores niveles de fosforilación de AKT (**Figura 33**), consistentemente con la aceleración en la aparición de estos carcinomas. Más aún, en un TMA de muestras de tiroides humano control o tumoral, la expresión de Sirt1 se ve significativamente aumentada en las muestras tumorales (**Figura 34**). Todos estos datos nos llevan a proponer que Sirt1 ejerce un papel oncogénico en tiroides.

A nivel mecanístico, todavía nos queda profundizar en los distintos experimentos para dar con la razón exacta de dicho efecto. Por un lado, la primera idea que probamos fue la posibilidad de que Sirt1 deacetilase directamente a PTEN, y eso pudiera reflejarse en una menor actividad. Esta idea cobró aun más fuerza cuando, paralelamente a la realización de estos estudios, un grupo independiente de

factores de crecimiento / insulina

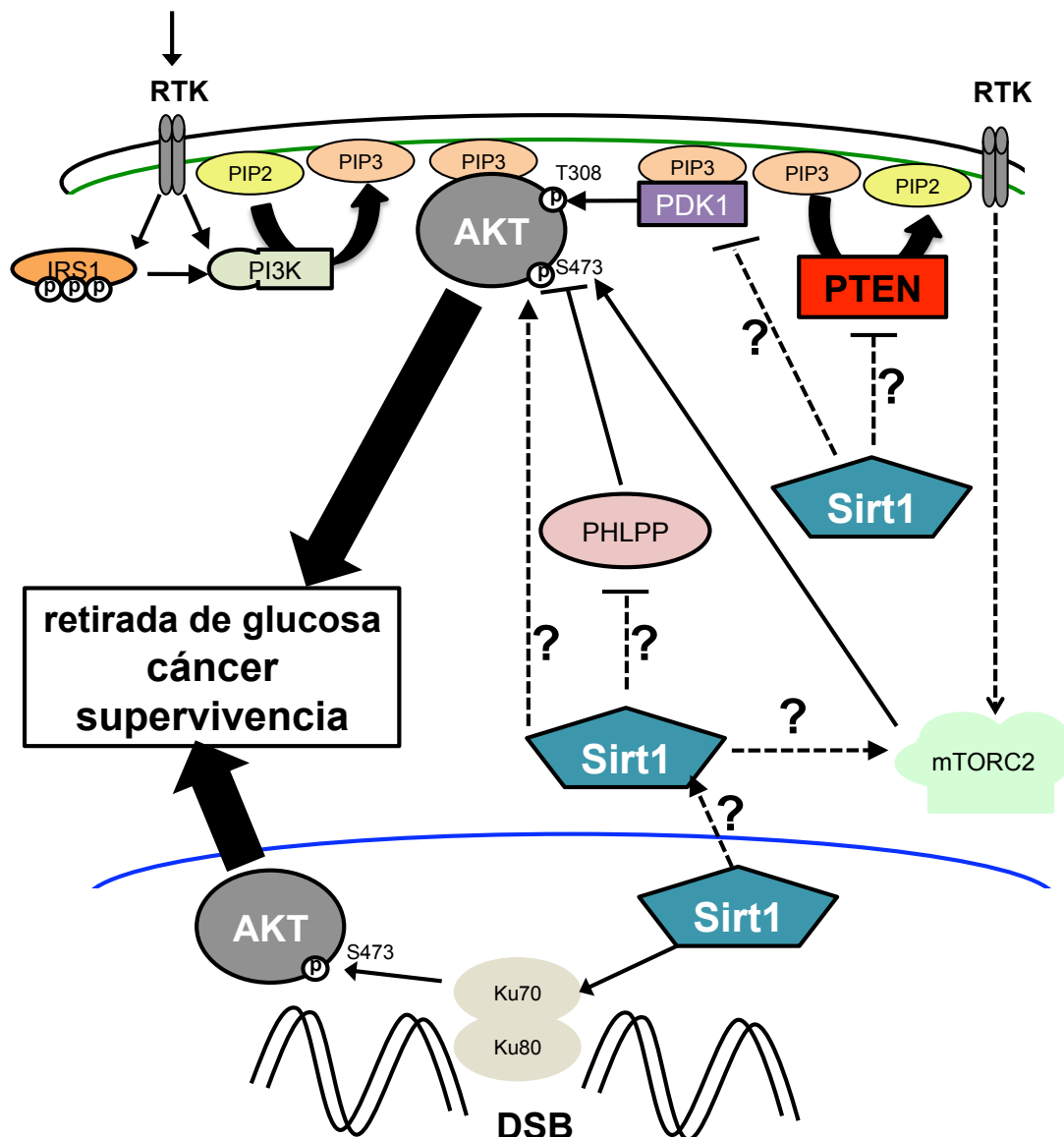


Figura 41. Esquema de las posibles formas en las que Sirt1 puede estar afectando a la fosforilación de AKT. Figura adaptada y modificada de Manning and Cantley, 2007.

investigadores publicó, en efecto, que Sirt1 era capaz de deacetilar a PTEN (Ikenoue *et al.*, 2008), aun sin entrar a fondo en las implicaciones funcionales de dicho efecto. Sin embargo, todos los intentos realizados hasta el momento para detectar el *status* en la acetilación de PTEN, utilizando una gran variedad de anticuerpos diferentes, han resultado infructuosos, de forma que no hemos podido determinar hasta ahora si una posible menor acetilación de PTEN podría ser la responsable del efecto observado *in vivo*, aunque no podemos descartarlo.

Existe la opción de que Sirt1 afecte a la expresión de PTEN, de forma que redujera sus niveles, pero los experimentos realizados hasta ahora muestran niveles parecidos de PTEN aún en los experimentos que muestran diferencias a nivel de la fosforilación de AKT (**Figuras 33 y 38**).

Otra posibilidad sería que Sirt1 afectase directamente a la fosforilación de AKT. Así, estudios preeliminares *in vitro* nos sugieren que esta hipótesis podría ser correcta, ya que se observa una disminución en los niveles de PDK1 y Ku70 tras tratar líneas celulares tiroides con un siRNA para Sirt1 (**Figura 36c**), y ambas proteínas pueden intervenir en la fosforilación de AKT, siendo especialmente interesante el caso de Ku70, por haberse implicado anteriormente a Sirt1 en su activación (Cohen *et al.*, 2004). Actualmente, estamos intentando validar y ampliar dichas observaciones.

No obstante, aun quedan muchas preguntas sin resolver. Por un lado, la falta de efecto tanto a nivel de la señalización de la insulina como a nivel de la formación de colonias tras la infección con los plásmidos expresando E6 y middleT (**Figura 35**), medidas ambas *in vitro* en MEFs. Esto nos lleva nuevamente a la idea de la especificidad celular o tisular en cuanto a las distintas funciones de Sirt1. Así, sería interesante comprobar dicha señalización en cultivos primarios de hepatocitos o, adicionalmente, comprobar si la sobreexpresión de Sirt1 *in vivo* en este contexto de déficit de PTEN podría traducirse en una mayor o más rápida liberación de insulina, que pudiera explicar el efecto observado en el GTT, en vez de trabajar con MEFs.

Por otra parte, observamos una aceleración de ciertos tumores (tiroides y próstata) asociados a la deficiencia de PTEN, pero no en otros (desorden linfoproliferativo y feocromocitoma), lo que de nuevo sugiere una distinta función de Sirt1 según el tejido en cuestión del que se trate.

Además, no hay una concordancia entre los efectos de la salermida en la proliferación de las líneas WRO-1 y FRO-1, que se para en ambas con su tratamiento, con el efecto del siRNA de Sirt1 en cuanto a la fosforilación de AKT, que disminuye sólo en el caso de la línea WRO-1, pero no en el de FRO-1. Esto podría indicar, por otra parte, que el efecto nocivo de Sirt1 se restringe a los carcinomas

foliculares, que son los que observamos en nuestro modelo de ratón, y no a los carcinomas papilares.

Adicionalmente, sería interesante dilucidar si la sobreexpresión de Sirt1 es importante para el inicio de la neoplasia o también para el desarrollo de la misma, ya que en este último supuesto sería potencialmente viable y útil el tratamiento de los carcinomas de tiroides con inhibidores de Sirt1 como la salermida. Por ello, estamos actualmente realizando experimentos *in vivo* encaminados a resolver dicha cuestión.

Más aún, tanto si Sirt1 afecta a la fosforilación de AKT de forma directa a través de sus quinasas o indirectamente a través de PTEN u otro mecanismo, quedaría por resolver si Sirt1 ejerce dichas funciones en el citoplasma, donde AKT y PTEN se encuentran mayoritariamente, o en el núcleo, que es donde Sirt1 ejerce principalmente sus funciones.

Por último, el TMA en humanos sugiere que la sobreexpresión de Sirt1 se asocia *per se* con el carcinoma de tiroides, mientras que en los ratones transgénicos para Sirt1 y con un fondo wt para PTEN no hemos conseguido observar ningún efecto diferencial a nivel de tiroides. Esto podría sugerirnos que, en ratón, las dos copias funcionales de PTEN son suficientes para contrarrestar el efecto de la sobreexpresión de Sirt1, mientras que en el humano, y por efectos distintivos entre especie, podría ser suficiente la elevación en los niveles de Sirt1 para desarrollar cáncer, aunque tampoco podemos descartar todavía que algunas de las muestras del TMA con Sirt1 aumentado pudieran presentar concomitantemente mutaciones o

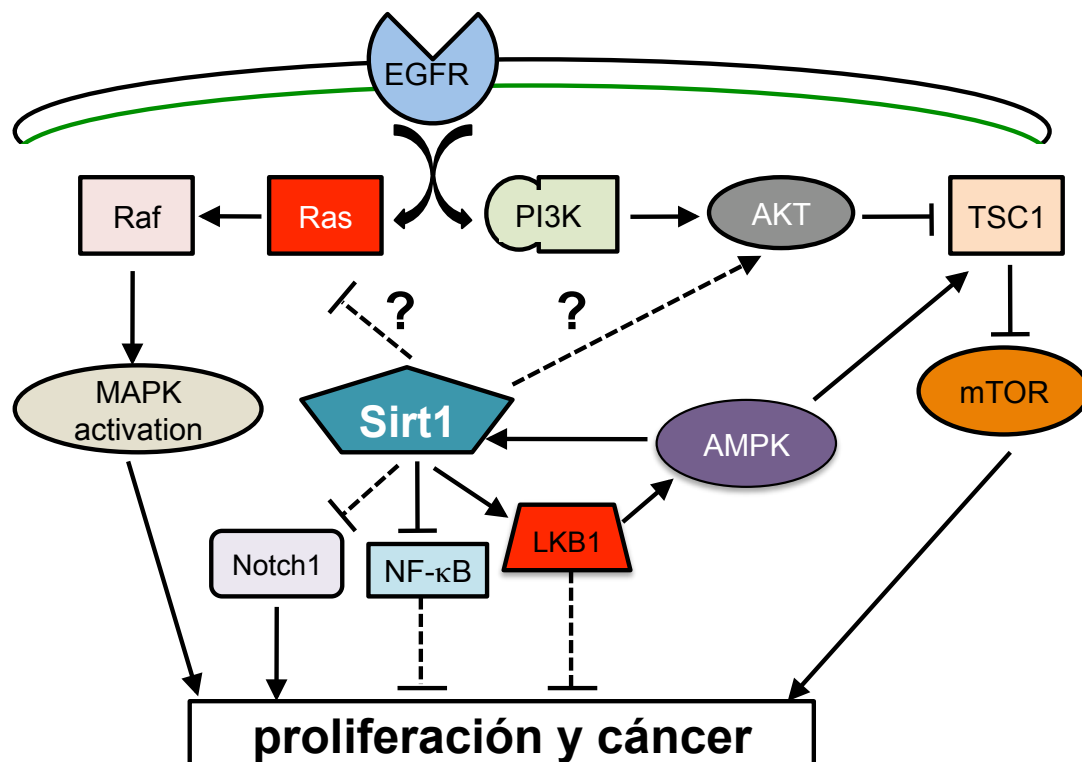


Figura 42. Esquema de las distintas hipótesis en estudio para explicar la acción supresora tumoral de Sirt1 en el pulmón. Figura adaptada y modificada de Shah, U., *et al.*, 2008.

delecciones en el locus de PTEN. Así, y aunque aún quedan muchas cuestiones que resolver para dilucidar el mecanismo concreto por el que Sirt1 acelera la aparición de carcinoma de tiroides en un fondo PTEN heterocigoto (representadas esquemáticamente en la **Figura 41**), lo que sí podemos postular con alto grado de confianza es que, en este contexto, Sirt1 jugaría un papel oncogénico *in vivo*, efecto que de momento no tiene precedentes en la literatura.

En último lugar, y aunque sea un resultado muy preliminar, el cruce de los ratones transgénicos de Sirt1 con los transgénicos KRas^{V12} nos ha permitido observar un dramático retraso en la aparición de los tumores de pulmón al estar Sirt1 sobreexpresado (**Figura 38**), siendo nuestras primeras hipótesis de trabajo para explicar dicho efecto la posible activación del supresor tumoral LKB1, que ya ha sido descrita para Sirt1 en el hígado (Hou *et al.*, 2008; Lan *et al.*, 2008), así como la represión en la actividad de la ruta de Notch gracias a Sirt1, a través de la inhibición sobre sus genes diana (Hisahara *et al.*, 2008; Prozorovski *et al.*, 2008) o por deacetilación directa de Notch1 (Potente *et al.*, comunicación oral, 2009) y/o la inhibición que Sirt1 ejerce sobre NFκB que ya hemos comentado con anterioridad, y que juega también un papel importante en la generación de tumores inducidos por KRas^{V12} (Meylan *et al.*, 2009). Una vez más, se necesitan estudios en profundidad para dilucidar el mecanismo o mecanismos protectores, así como estudios concomitantes que expliquen la aparente acción específica de Sirt1 según el tejido, puesto que la activación de AKT acelera la carcinogénesis de pulmón dirigida por KRas^{V12}, sin embargo, a diferencia del caso del tiroides, Sirt1 protege del desarrollo de estos tumores. Todas estas posibilidades están representadas en la **Figura 42**.

En conjunto, todos estos resultados nos han permitido profundizar en la relación entre Sirt1 y el desarrollo de patologías cancerosas y, en su mayoría, sugieren un rol supresor de tumores para Sirt1 (tumores espontáneos, tumores hepáticos asociados a DEN/HFD o tumores de pulmón dirigidos por KRas^{V12}) pero, por otra parte, no hemos observado efecto alguno en otro tipo de protocolos (fibrosarcomas inducidos por 3MC o supervivencia en fondo p53-KO) e, incluso, hemos observado un papel oncogénico para Sirt1 en el caso de un contexto deficiente en PTEN. Así, a pesar de tener un efecto mayoritariamente beneficioso, creemos absolutamente necesario realizar investigaciones adicionales que esclarezcan el efecto específico de Sirt1 en cada tejido en particular, ya que los efectos de Sirt1 en la fisiología y la patología parecen ser altamente dependientes del tipo concreto de tejido del que se trate. Dichos estudios, además, podrían traducirse en el futuro en el uso de activadores o inhibidores específicos para Sirt1 para el tratamiento de distintos tipos de cáncer en humanos.

Conclusiones

1. Sirt1 protege del daño metabólico asociado a la ingesta de una dieta rica en grasas.

2. La protección ejercida por Sirt1 a nivel metabólico se debe, al menos, a la inhibición de la ruta de señalización NF κ B y a la activación de la vía de PGC-1 α , de forma que ambos efectos confluyen proporcionando una menor inflamación hepática, acompañado también de una menor infiltración de macrófagos e inflamación en el tejido adiposo blanco (WAT).

3. La sobreexpresión de Sirt1 mejora la salud durante el envejecimiento en el ratón. Así, protege del desarrollo espontáneo de *diabetes mellitus* tipo II, osteoporosis o cáncer al envejecer pero, sin embargo, no consigue aumentar la longevidad de los ratones, al menos con los niveles de sobreexpresión alcanzados en este trabajo.

4. Sirt1 protege del desarrollo de cáncer hepático en un contexto de síndrome metabólico.

5. La protección frente al desarrollo de dichos tumores en hígado se debe, por un lado, a la protección inicial frente al daño en el ADN de los hepatocitos causado por el carcinógeno DEN y, por otra parte, a la protección que confiere Sirt1 frente al daño causado por una dieta rica en grasas.

6. La sobreexpresión de Sirt1 no recapitula los principales fenotipos atribuidos a la CR, como el aumento en la longevidad, el aumento en la actividad locomotora o la protección frente al desarrollo de cáncer en ratones p53-KO.

7. Sirt1 acelera el desarrollo de cáncer de tiroides en un contexto deficiente en PTEN.

8. Sirt1 se encuentra aumentado en muestras humanas de cáncer de tiroides con respecto a su expresión en muestras de tiroides control.

9. Sirt1 protege del desarrollo de cáncer de pulmón dirigido por el oncogén KRas^{V12}.

10. El conjunto de resultados sobre cáncer indican que Sirt1 podría ser una diana terapéutica muy interesante para tratar el cáncer hepático y el cáncer de pulmón a través del uso de activadores, así como para tratar el cáncer tiroideo a través del uso de inhibidores.

Bibliografía

Ahmed, M.H., and Byrne, C.D. (2007). Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Drug Discov Today* 12, 740-747.

Alcendor, R.R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S.F., and Sadoshima, J. (2007). Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 100, 1512-1521.

Arkan, M.C., Hevener, A.L., Greten, F.R., Maeda, S., Li, Z.W., Long, J.M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11, 191-198.

Avizienyte, E., Loukola, A., Roth, S., Hemminki, A., Tarkkanen, M., Salovaara, R., Arola, J., Butzow, R., Husgafvel-Pursiainen, K., Kokkola, A., *et al.* (1999). LKB1 somatic mutations in sporadic tumors. *Am J Pathol* 154, 677-681.

Banks, A.S., Kon, N., Knight, C., Matsumoto, M., Gutierrez-Juarez, R., Rossetti, L., Gu, W., and Accili, D. (2008). SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 8, 333-341.

Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Hathaway, N.A., Sharpless, N.E., Loda, M., Carrasco, D.R., and DePinho, R.A. (2002). Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* 419, 162-167.

Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., *et al.* (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337-342.

Berrigan, D., Perkins, S.N., Haines, D.C., and Hursting, S.D. (2002). Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice. *Carcinogenesis* 23, 817-822.

Blander, G., and Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73, 417-435.

Boily, G., He, X.H., Pearce, B., Jardine, K., and McBurney, M.W. (2009). SirT1-null mice develop tumors at normal rates but are poorly protected by resveratrol. *Oncogene* 28, 2882-2893.

Boily, G., Seifert, E.L., Bevilacqua, L., He, X.H., Sabourin, G., Estey, C., Moffat, C., Crawford, S., Saliba, S., Jardine, K., *et al.* (2008). SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS One* 3, e1759.

Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M.C., van Veen, E., Czopik, A., Steele, A.D., Crowe, H., Marmor, S., Luo, J., *et al.* (2007). SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 6, 759-767.

Bordone, L., and Guarente, L. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 298-305.

Bordone, L., Motta, M.C., Picard, F., Robinson, A., Jhala, U.S., Apfeld, J., McDonagh, T., Lemieux, M., McBurney, M., Szilvasi, A., *et al.* (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 4, e31.

Bowker, S.L., Majumdar, S.R., Veugelers, P., and Johnson, J.A. (2006). Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 29, 254-258.

Bozulic, L., and Hemmings, B.A. (2009). PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol* 21, 256-261.

Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., *et al.* (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.

Cai, D., Yuan, M., Frantz, D.F., Melendez, P.A., Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11, 183-190.

Canto, C., and Auwerx, J. (2009). PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 20, 98-105.

Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056-1060.

Canto, C., Jiang, L.Q., Deshmukh, A.S., Matak, C., Coste, A., Lagouge, M., Zierath, J.R., and Auwerx, J. (2010). Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab* 11, 213-219.

Carretero, J., Medina, P.P., Pio, R., Montuenga, L.M., and Sanchez-Cespedes, M. (2004). Novel and natural knockout lung cancer cell lines for the LKB1/STK11 tumor suppressor gene. *Oncogene* 23, 4037-4040.

Chang, J., Wang, Z., Tang, E., Fan, Z., McCauley, L., Franceschi, R., Guan, K., Krebsbach, P.H., and Wang, C.Y. (2009). Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB. *Nat Med* 15, 682-689.

Chen, D., Steele, A.D., Lindquist, S., and Guarente, L. (2005). Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science* 310, 1641.

Cheng, H.L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J.P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F.W., and Chua, K.F. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10794-10799.

Chua, K.F., Mostoslavsky, R., Lombard, D.B., Pang, W.W., Saito, S., Franco, S., Kaushal, D., Cheng, H.L., Fischer, M.R., Stokes, N., *et al.* (2005). Mammalian SIRT1 limits replicative life span in response to chronic genotoxic stress. *Cell Metab* 2, 67-76.

Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., de Cabo, R., and Sinclair, D.A. (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305, 390-392.

Combs, T.P., Berg, A.H., Obici, S., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108, 1875-1881.

Di Cristofano, A., Kotsi, P., Peng, Y.F., Cordon-Cardo, C., Elkon, K.B., and Pandolfi, P.P. (1999). Impaired Fas response and autoimmunity in *Pten*^{+/-} mice. *Science* 285, 2122-2125.

Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (1998). *Pten* is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 19, 348-355.

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.

Efeyan, A., Garcia-Cao, I., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., and Serrano, M. (2006). Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* 443, 159.

Efeyan, A., and Serrano, M. (2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 6, 1006-1010.

Escande, C., Chini, C.C., Nin, V., Dykhouse, K.M., Novak, C.M., Levine, J., van Deursen, J., Gores, G.J., Chen, J., Lou, Z., *et al.* (2010). Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J Clin Invest* 120, 545-558.

Evans, J.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., Alessi, D.R., and Morris, A.D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330, 1304-1305.

Fabrizio, P., Gattazzo, C., Battistella, L., Wei, M., Cheng, C., McGrew, K., and Longo, V.D. (2005). Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell* 123, 655-667.

Feige, J.N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S.M., Milne, J.C., Lambert, P.D., Matak, C., Elliott, P.J., and Auwerx, J. (2008). Specific SIRT1 activation mimics

low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* 8, 347-358

Firestein, R., Blander, G., Michan, S., Oberdoerffer, P., Ogino, S., Campbell, J., Bhimavarapu, A., Luikenhuis, S., de Cabo, R., Fuchs, C., *et al.* (2008). The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One* 3, e2020.

Freeman, J.E., Stirling, D., Russell, A.L., and Wolf, C.R. (1992). cDNA sequence, deduced amino acid sequence, predicted gene structure and chemical regulation of mouse Cyp2e1. *Biochem J* 281 (Pt 3), 689-695.

Gadjeva, M., Tomczak, M.F., Zhang, M., Wang, Y.Y., Dull, K., Rogers, A.B., Erdman, S.E., Fox, J.G., Carroll, M., and Horwitz, B.H. (2004). A role for NF-kappa B subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol* 173, 5786-5793.

Garcia-Cao, I., Garcia-Cao, M., Martin-Caballero, J., Criado, L.M., Klatt, P., Flores, J.M., Weill, J.C., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2002). "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 21, 6225-6235.

Giraldo, P., and Montoliu, L. (2001). Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res* 10, 83-103.

Guarente, L. (2006). Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* 444, 868-874.

Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4, 111-120

Haigis, M.C., Mostoslavsky, R., Haigis, K.M., Fahie, K., Christodoulou, D.C., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Karow, M., Blander, G., *et al.* (2006). SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126, 941-954.

Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., Bradley, A., and Donehower, L.A. (1993). Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet* 5, 225-229.

Herranz, D., Muñoz-Martin M., Cañamero, M., Mulero, F., Martinez-Pastor, B., Fernandez-Capetillo, O., and Serrano, M. (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* (in press)

Hisahara, S., Chiba, S., Matsumoto, H., Tanno, M., Yagi, H., Shimohama, S., Sato, M., and Horio, Y. (2008). Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15599-15604.

Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.

Hou, X., Xu, S., Maitland-Toolan, K.A., Sato, K., Jiang, B., Ido, Y., Lan, F., Walsh, K., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., *et al.* (2008). SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 283, 20015-20026.

Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., *et al.* (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.

Huang, X., Wulschleger, S., Shpiro, N., McGuire, V.A., Sakamoto, K., Woods, Y.L., McBurnie, W., Fleming, S., and Alessi, D.R. (2008). Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. *Biochem J* 412, 211-221.

Huffman, D.M., Grizzle, W.E., Bamman, M.M., Kim, J.S., Eltoum, I.A., Elgavish, A., and Nagy, T.R. (2007). SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res* 67, 6612-6618.

Hursting, S.D., Perkins, S.N., and Phang, J.M. (1994). Calorie restriction delays spontaneous tumorigenesis in p53-knockout transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7036-7040.

Ikenoue, T., Inoki, K., Zhao, B., and Guan, K.L. (2008). PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Res* 68, 6908-6912.

Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., *et al.* (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218-220.

Ji, H., Ramsey, M.R., Hayes, D.N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M.C., Shimamura, T., Perera, S.A., *et al.* (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* 448, 807-810.

Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13, 2570-2580.

Kamel, C., Abrol, M., Jardine, K., He, X., and McBurney, M.W. (2006). SirT1 fails to affect p53-mediated biological functions. *Aging Cell* 5, 81-88.

Kanfi, Y., Peshti, V., Gil, R., Naiman, S., Nahum, L., Levin, E., Kronfeld-Schor, N., and Cohen, H.Y. (2009). SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity. *Aging Cell*.

Kang, J.S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Gonzalez, F.J., and Fukushima, S. (2007). Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res* 67, 11141-11146.

Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-227.

Kisseleva, T., Song, L., Vorontchikhina, M., Feirt, N., Kitajewski, J., and Schindler, C. (2006). NF-kappaB regulation of endothelial cell function during LPS-induced toxemia and cancer. *J Clin Invest* 116, 2955-2963.

Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114, 1299-1307.

Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., *et al.* (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127, 1109-1122.

Lan, F., Cacicedo, J.M., Ruderman, N., and Ido, Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 283, 27628-27635.

Lara, E., Mai, A., Calvanese, V., Altucci, L., Lopez-Nieva, P., Martinez-Chantar, M.L., Varela-Rey, M., Rotili, D., Nebbioso, A., Ropero, S., *et al.* (2009). Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect. *Oncogene* 28, 781-791.

Lin, S.J., Defossez, P.A., and Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-2128.

Lombard, D.B., Alt, F.W., Cheng, H.L., Bunkenborg, J., Streeper, R.S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., *et al.* (2007). Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 27, 8807-8814.

Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137-148.

Maeda, S., Kamata, H., Luo, J.L., Leffert, H., and Karin, M. (2005). IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 121, 977-990.

Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.

Matheu, A., Maraver, A., Klatt, P., Flores, I., Garcia-Cao, I., Borrás, C., Flores, J.M., Vín, J., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 448, 375-379.

Matheu, A., Pantoja, C., Efeyan, A., Criado, L.M., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Klatt, P., and Serrano, M. (2004). Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* 18, 2736-2746.

Matsuzawa, N., Takamura, T., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Ando, H., Yokoyama, M., Honda, M., Zen, Y., Nakanuma, Y., *et al.* (2007). Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 46, 1392-1403.

McBurney, M.W., Yang, X., Jardine, K., Hixon, M., Boekelheide, K., Webb, J.R., Lansdorp, P.M., and Lemieux, M. (2003). The mammalian SIR2 α protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol* 23, 38-54.

McCay, C.M., 1935. Cellulose in the diet of mice and rats. *J. Nutr.* 435–447.

Medina, J., Fernández-Salazar, L.I., García-Buey, L., and Moreno-Otero, R. (2004). Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 27, 2057-2066.

Mendez, J., and Stillman, B. (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* 20, 8602-8612.

Meylan, E., Dooley, A.L., Feldser, D.M., Shen, L., Turk, E., Ouyang, C., and Jacks, T. (2009). Requirement for NF- κ B signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* 462, 104-107.

Milne, J.C., Lambert, P.D., Schenk, S., Carney, D.P., Smith, J.J., Gagne, D.J., Jin, L., Boss, O., Perni, R.B., Vu, C.B., *et al.* (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450, 712-716.

Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., Pang, W.W., Fischer, M.R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M.M., *et al.* (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124, 315-329.

Moynihan, K.A., Grimm, A.A., Plueger, M.M., Bernal-Mizrachi, E., Ford, E., Cras-Meneur, C., Permutt, M.A., and Imai, S. (2005). Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2, 105-117.

Nakagawa, T., Lomb, D.J., Haigis, M.C., and Guarente, L. (2009). SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 137, 560-570.

Naugler, W.E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A.M., and Karin, M. (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 317, 121-124.

Nemoto, S., Fergusson, M.M., and Finkel, T. (2004). Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* 306, 2105-2108.

Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S.K., Hartlerode, A., Stegmuller, J., Hafner, A., Loerch, P., *et al.* (2008). SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135, 907-918.

Ogura, M., Nakamura, Y., Tanaka, D., Zhuang, X., Fujita, Y., Obara, A., Hamasaki, A., Hosokawa, M., and Inagaki, N. (2010). Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 73-78.

Ota, H., Tokunaga, E., Chang, K., Hikasa, M., Iijima, K., Eto, M., Kozaki, K., Akishita, M., Ouchi, Y., and Kaneki, M. (2006). Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like

growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene* 25, 176-185.

Ota, T., Takamura, T., Kurita, S., Matsuzawa, N., Kita, Y., Uno, M., Akahori, H., Misu, H., Sakurai, M., Zen, Y., *et al.* (2007). Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 132, 282-293.

Pacholec, M., Chrnyk, B.A., Cunningham, D., Flynn, D., Griffith, D.A., Griffor, M., Loulakis, P., Pabst, B., Qiu, X., Stockman, B., *et al.* (2010) SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem.* 285, 8340-8351.

Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H., and Karin, M. (2010) Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* 140, 197-208.

Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price, N.L., Labinskyy, N., Swindell, W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., *et al.* (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 8, 157-168.

Perlemuter, G., Bigorgne, A., Cassard-Doulcier, A.M., and Naveau, S. (2007). Nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to patient care. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3, 458-469.

Pfluger, P.T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M., and Tschop, M.H. (2008). Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9793-9798.

Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M.W., and Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429, 771-776.

Pichard, L., Raulet, E., Fabre, G., Ferrini, J.B., Ourlin, J.C., and Maurel, P. (2006). Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol* 320, 283-293.

Podsypanina, K., Ellenson, L.H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P.E., and Parsons, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1563-1568.

Potente, M., Sirt1 limits endothelial Notch signalling during vascular growth through NICD deacetylation (2009) comunicación oral en el congreso Idibell Cancer Conference on Sirtuins.

Powell, E.E., Jonsson, J.R., and Clouston, A.D. (2005). Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology* 42, 5-13.

Prozorovski, T., Schulze-Topphoff, U., Glumm, R., Baumgart, J., Schroter, F., Ninnemann, O., Siegert, E., Bendix, I., Brustle, O., Nitsch, R., *et al.* (2008). Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol* 10, 385-394.

Pruitt, K., Zinn, R.L., Ohm, J.E., McGarvey, K.M., Kang, S.H., Watkins, D.N., Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2006). Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* 2, e40.

Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113-118.

Rogina, B., and Helfand, S.L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15998-16003.

Ruocco, M.G., Maeda, S., Park, J.M., Lawrence, T., Hsu, L.C., Cao, Y., Schett, G., Wagner, E.F., and Karin, M. (2005). I{kappa}B kinase (IKK){beta}, but not IKK{alpha}, is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J Exp Med* 201, 1677-1687.

Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J.M., Westra, W.H., Herman, J.G., and Sidransky, D. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 62, 3659-3662.

Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 6, 168-170.

Shah, U., Sharpless, N.E., and Hayes, D.N. (2008). LKB1 and lung cancer: more than the usual suspects. *Cancer Res* 68, 3562-3565.

Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116, 3015-3025.

Shoelson, S.E., Herrero, L., and Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169-2180.

Sinclair, D.A. (2005). Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 126, 987-1002.

St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., *et al.* (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397-408.

Sun, A.Y., Simonyi, A., and Sun, G.Y. (2002). The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med* 32, 314-318.

Sun, D., Ren, H., Oertel, M., Sellers, R.S., Shafritz, D.A., and Zhu, L. (2008). Inactivation of p27Kip1 promotes chemical mouse liver tumorigenesis in the resistant strain C57BL/6J. *Mol Carcinog* 47, 47-55.

Sundaresan, N.R., Gupta, M., Kim, G., Rajamohan, S.B., Isbatan, A., and Gupta, M.P. (2009). Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest* 119, 2758-2771.

Taubes, G. (2009). Insulin resistance. Prosperity's plague. *Science* 325, 256-260.

Tissenbaum, H.A., and Guarente, L. (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227-230.

- Vakhrusheva, O., Smolka, C., Gajawada, P., Kostin, S., Boettger, T., Kubin, T., Braun, T., and Bober, E. (2008). Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res* 102, 703-710.
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., and Cellierino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* 16, 296-300.
- Vaquero, A., Scher, M.B., Lee, D.H., Sutton, A., Cheng, H.L., Alt, F.W., Serrano, L., Sternglanz, R., and Reinberg, D. (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev* 20, 1256-1261.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149-159.
- Wang, R.H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H.S., Cao, L., Xiao, C., Kim, S., Xu, X., Zheng, Y., Chilton, B., *et al.* (2008). Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* 14, 312-323.
- Wexler, H., and Rosenberg, S.A. (1979). Pulmonary metastases from autochthonous 3-methylcholanthrene-induced murine tumors. *J Natl Cancer Inst* 63, 1393-1395.
- Wong, J.T., Kim, P.T., Peacock, J.W., Yau, T.Y., Mui, A.L., Chung, S.W., Sossi, V., Doudet, D., Green, D., Ruth, T.J., *et al.* (2007). Pten (phosphatase and tensin homologue gene) haploinsufficiency promotes insulin hypersensitivity. *Diabetologia* 50, 395-403.
- Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., and Sinclair, D. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686-689.
- Xu, F., Gao, Z., Zhang, J., Rivera, C.A., Yin, J., Weng, J., and Ye, J. (2010). Lack of SIRT1 (Mammalian Sirtuin 1) Activity Leads to Liver Steatosis in the SIRT1+/- Mice: A Role of Lipid Mobilization and Inflammation. *Endocrinology* (in press).

Xu, Z., Chen, L., Leung, L., Yen, T.S., Lee, C., and Chan, J.Y. (2005). Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4120-4125.

Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., and Mayo, M.W. (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23, 2369-2380.

Anexo

Artículos publicados directamente relacionados con la presente Tesis Doctoral:

Pfluger, P.T*, Herranz, D.*, Velasco-Miguel, S.*, Serrano, M., and Tschop, M.H. (2008). Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9793-9798. *: los autores contribuyeron igualmente al trabajo.

Herranz, D., Muñoz-Martin, M., Cañamero, M., Mulero, F., Martinez-Pastor, B., Fernandez-Capetillo, O., and Serrano, M. (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* (in press)

Otros artículos publicados:

Efeyan, A., Garcia-Cao, I., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., and Serrano, M. (2006). Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* 443, 159.

Efeyan, A., Ortega-Molina, A., Velasco-Miguel, S., Herranz, D., Vassilev, L.T., and Serrano, M. (2007). Induction of p53-dependent senescence by the MDM2 antagonist nutlin-3a in mouse cells of fibroblast origin. *Cancer Res* 67, 7350-7357.

Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage

Paul T. Pfluger*, Daniel Herranz†, Susana Velasco-Miguel†, Manuel Serrano†‡, and Matthias H. Tschöp*

*Department of Psychiatry, Obesity Research Center, Genome Research Institute, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH 45237; and †Spanish National Cancer Research Center (CNIO), 28029 Madrid, Spain

Communicated by Margarita Salas, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain, March 27, 2008 (received for review December 14, 2007)

The identification of new pharmacological approaches to effectively prevent, treat, and cure the metabolic syndrome is of crucial importance. Excessive exposure to dietary lipids causes inflammatory responses, deranges the homeostasis of cellular metabolism, and is believed to constitute a key initiator of the metabolic syndrome. Mammalian Sirt1 is a protein deacetylase that has been involved in resveratrol-mediated protection from high-fat diet-induced metabolic damage, but direct proof for the implication of Sirt1 has remained elusive. Here, we report that mice with moderate overexpression of Sirt1 under the control of its natural promoter exhibit fat mass gain similar to wild-type controls when exposed to a high-fat diet. Higher energy expenditure appears to be compensated by a parallel increase in food intake. Interestingly, transgenic Sirt1 mice under a high-fat diet show lower lipid-induced inflammation along with better glucose tolerance, and are almost entirely protected from hepatic steatosis. We present data indicating that such beneficial effects of Sirt1 are due to at least two mechanisms: induction of antioxidant proteins MnSOD and Nrf1, possibly via stimulation of PGC1 α , and lower activation of proinflammatory cytokines, such as TNF α and IL-6, via downmodulation of NF κ B activity. Together, these results provide direct proof of the protective potential of Sirt1 against the metabolic consequences of chronic exposure to a high-fat diet.

inflammation | metabolism | NF κ B | sirtuins | steatosis

Driven by the need for potent and safe options to treat obesity, diabetes, and the metabolic syndrome, numerous efforts are currently underway to achieve a better understanding of the molecular networks controlling cellular glucose, lipid, and energy metabolism (1–3). It is generally accepted that gene–environment interactions (such as the effect of high-fat diets on the molecular pathways that maintain energy homeostasis) play a key role in the pathogenesis of the metabolic syndrome (4). Intriguingly, several reports recently showed that specific dietary fatty acids can directly activate Toll-like receptors, which are better known as components of the innate immune system recognizing bacteria-derived fatty acids (5–7). The resulting immune response promotes the systemic activation of proinflammatory pathways including NF κ B, TNF α , or IL-6 (5, 6). This chain of events is believed to ultimately lead to insulin resistance, setting in motion the vicious cycle of the metabolic syndrome (8).

Recently, a series of studies in several organisms revealed multiple important links of the Sirtuin family of proteins with energy metabolism and inflammation (9–11). Also known as silent information regulator 2 (Sir2)-related enzymes, the Sirtuins have been well conserved throughout evolution and represent a family of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzymes that deacetylate residues of acetylated lysine. The mammalian sirtuins Sirt1–Sirt7 are implicated in a number of cellular and physiological functions including gene silencing, apoptosis, mitochondrial function, energy homeostasis, and longevity (12). Among its multiple reported targets, Sirt1 deacetylates and thereby activates PGC1 α , an essential cofactor in mitochondrial biogenesis driving metabolic rate (10). Thus, activation of Sirt1 with small molecules, such as resveratrol, may represent a promising strategy for preventing and

treating metabolic syndrome (13). This hypothesis has gained support recently from newly developed chemical activators of Sirt1 that boost mitochondrial capacity and improve whole-body glucose homeostasis upon high-fat diet (14). However, these small molecules could impinge on multiple members of the Sirtuin family, as well as on other targets yet to be discovered. To directly test the effect of Sirt1 on the metabolic impairment induced by chronic exposure to dietary lipids, we generated mice with moderate overexpression of Sirt1 and analyzed their metabolic phenotype.

Results

Generation of Sirt1 Transgenic Mice. Transgenesis was performed by using a large genomic construct (174 kb) containing the entire Sirt1 gene in its natural genomic context (Fig. 1A). In general, these large genomic transgenes have the advantage of providing a pattern of tissue expression very similar or identical to the endogenous gene (15). The Sirt1 genomic construct used also contains the adjacent gene Dnajc12 (Fig. 1A). This gene belongs to a large family of heat shock proteins, the DnaJ/Hsp40 family, with >40 members in mammalian genomes (16). We reasoned that the likely effect of increasing the expression of Dnajc12 is of little relevance because of (i) the large number of paralogs already present in the genome, (ii) the lack of previous evidence implicating Hsp40 proteins in the processes explored in this report, and (iii) the absence of effect of Dnajc12 inhibition on the molecular pathways affected by Sirt1 (see below). Transgenesis was performed by standard microinjection of fertilized oocytes. One founder mouse was identified that contained a single complete copy of the Sirt1 genomic insert and that transmitted the transgenic allele to the progeny (supporting information (SI) Fig. S1 and Fig. S2). This line of transgenic mice is abbreviated here as Sirt1-tg or simply tg.

Expression of Sirt1 was analyzed in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Fig. 1B), as well as in different tissues from Sirt1-tg mice (Fig. 1C), and it was found that Sirt1 was moderately overexpressed in all of the tissues tested. Quantitative RT-PCR indicated a homogeneous level of overexpression (ranging from 2- to 4-fold in liver, brown adipose tissue, and muscle; for these values, see below). This increase in Sirt1 mRNA was paralleled by a similar increase in protein levels (ranging from 2- to 4-fold in different tissues; see Fig. 1C). In the case of liver, a more extensive quantification of the protein levels indicated an average overexpression of \approx 3-fold (2.7 ± 0.35 , $n = 7$). Functionality of the transgene was confirmed genetically by rescue of three overt phenotypes present in Sirt1 knockout mice, namely, partially penetrant perinatal lethality, low weight, and microphthalmia of the surviving mice (17). In brief, Sirt1(–/–;tg) mice were born and viable at the expected Mendelian

Author contributions: P.T.P., D.H., and S.V.-M. contributed equally to this work; M.S. and M.H.T. designed research; P.T.P., D.H., and S.V.-M. performed research; D.H., S.V.-M., and M.S. contributed new reagents/analytic tools; P.T.P., D.H., and M.H.T. analyzed data; and P.T.P., M.S., and M.H.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: mserrano@cnio.es.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0802917105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

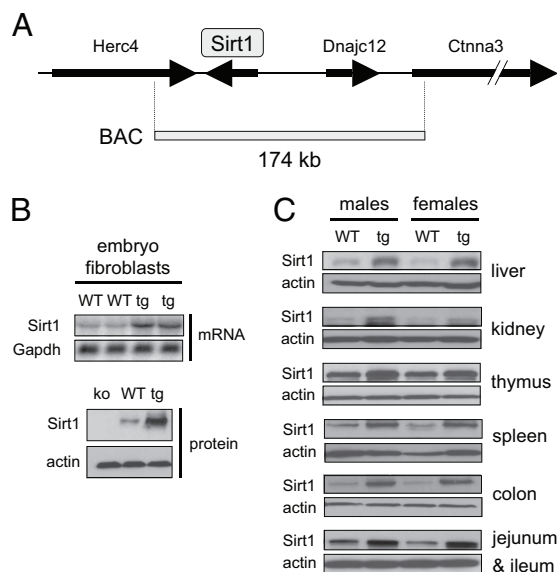


Fig. 1. Generation of a BAC-based transgenic Sirt1 mouse line. (A) Scheme of the Bacterial Artificial Chromosome (BAC) used to generate the Sirt1-tg mouse strain. (B) Levels of Sirt1 mRNA (Upper) and Sirt1 protein (Lower) in mouse embryo fibroblasts. (C) Levels of Sirt1 protein in the indicated tissues.

ratio, with no indication of perinatal lethality, had a normal weight, and did not present with microphthalmia (Fig. S3).

Balanced Energy Homeostasis of Sirt1 Transgenic Mice. Deficiency for Sirt1 has previously been shown to reduce body weight in mice [(17) and Fig. S3]. Therefore, we began our characterization by examining the effects of moderate Sirt1 overexpression on the regulation of body weight, food intake, and energy balance regulation. Body weights and body lengths of 8- to 10-week-old transgenic Sirt1 mice did not differ from wild-type (WT) control mice on a standard diet (SD) (Fig. 2A, and data not shown). Subsequent exposure for 19 weeks to a high-fat diet (HFD) did not lead to significant differences in body weight (Fig. 2A), fat mass (Fig. 2C), or lean mass (Fig. 2D), although a trend toward lower body weight and fat mass was

observed in tg mice on HFD compared with WT controls. Neither plasma leptin levels nor adiponectin levels differed between genotypes on either SD or HFD (Table S1). Noteworthy, tg mice exhibited increased food intake compared with WT mice on HFD (Fig. 2B). This increase in food intake was corroborated by using in-depth analysis with an automated food intake-monitoring system (Fig. S4A). Therefore, we examined next whether the increase in caloric intake of tg mice on HFD was compensated by a concomitant increase in energy expenditure. Consistent with this hypothesis, indirect calorimetry revealed that tg mice showed higher energy expenditure than WT mice on HFD (Fig. 2E Right and F). No differences were observed in mice fed SD (Fig. 2E Left and F). Real-time PCR analysis of UCP1 levels in brown adipose tissue (BAT) suggested that BAT thermogenesis was not the cause for this increase in energy expenditure, despite overexpression of Sirt1 in BAT (Fig. S4B). We next tested activity-induced thermogenesis by monitoring motor activity in a specific home cage beam break system, but failed to find significant changes in total locomotion (Fig. S4C), ambulatory movement, or stationary movement (Fig. S4D). The energetic cost of muscular activity seemed also unchanged, as indicated by a comparable expression of UCP3 and of several mitochondrial respiratory chain enzymes in the quadriceps muscle, despite overexpression of Sirt1 (Fig. S4E). No differences in respiratory quotient were found, suggesting comparable fuel-partitioning patterns in WT and tg mice (Fig. S4F). In summary, although Sirt1 transgenic mice present a modest increase in food intake under HFD, this is compensated by a similarly modest increase in energy expenditure, thus indicating a balanced energy homeostasis.

Sirt1 Transgenic Mice Are Protected from HFD-Induced Hepatic Steatosis. Chronic HFD exposure causes accumulation of lipids in the liver, a process leading to fatty liver disease, also known as Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), and eventually to Non-alcoholic Steato-Hepatitis (NASH) (19). Sirt1 has been implicated in the control of lipid metabolism (9). We therefore investigated hepatic accumulation of lipids by oil red staining of frozen liver sections (Fig. 3A). As expected, small amounts of lipid droplets were found in liver sections of both WT and tg mice after 19 weeks on SD. In contrast, after 19 weeks of HFD, WT mice presented with severe hepatosteatosis, including massive accumulation of large lipid droplets. Importantly, Sirt1 tg mice were almost entirely

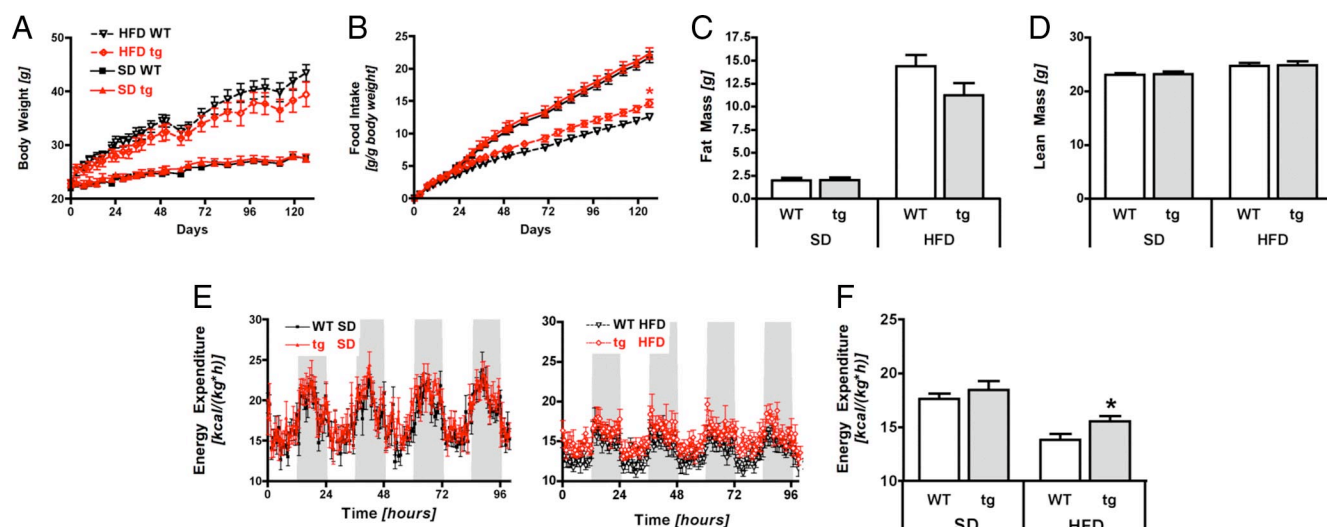


Fig. 2. Energy homeostasis of transgenic Sirt1 mice. (A) Body weight of wild type (WT) or transgenic (tg) Sirt1 mice during exposure to a standard chow diet (SD) or a high-fat diet (HFD). (B) Food intake. (C) Fat mass in WT and tg mice after 19 weeks of exposure to SD or HFD. (D) Lean mass. (E and F) Energy expenditure per kg of body weight after 8 weeks of SD or HFD: 5-day measurements in SD mice (E Left) or HFD mice (E Right), and total mean values (F). $n = 7-8$ per group; means \pm SEM; *, $P < 0.05$.

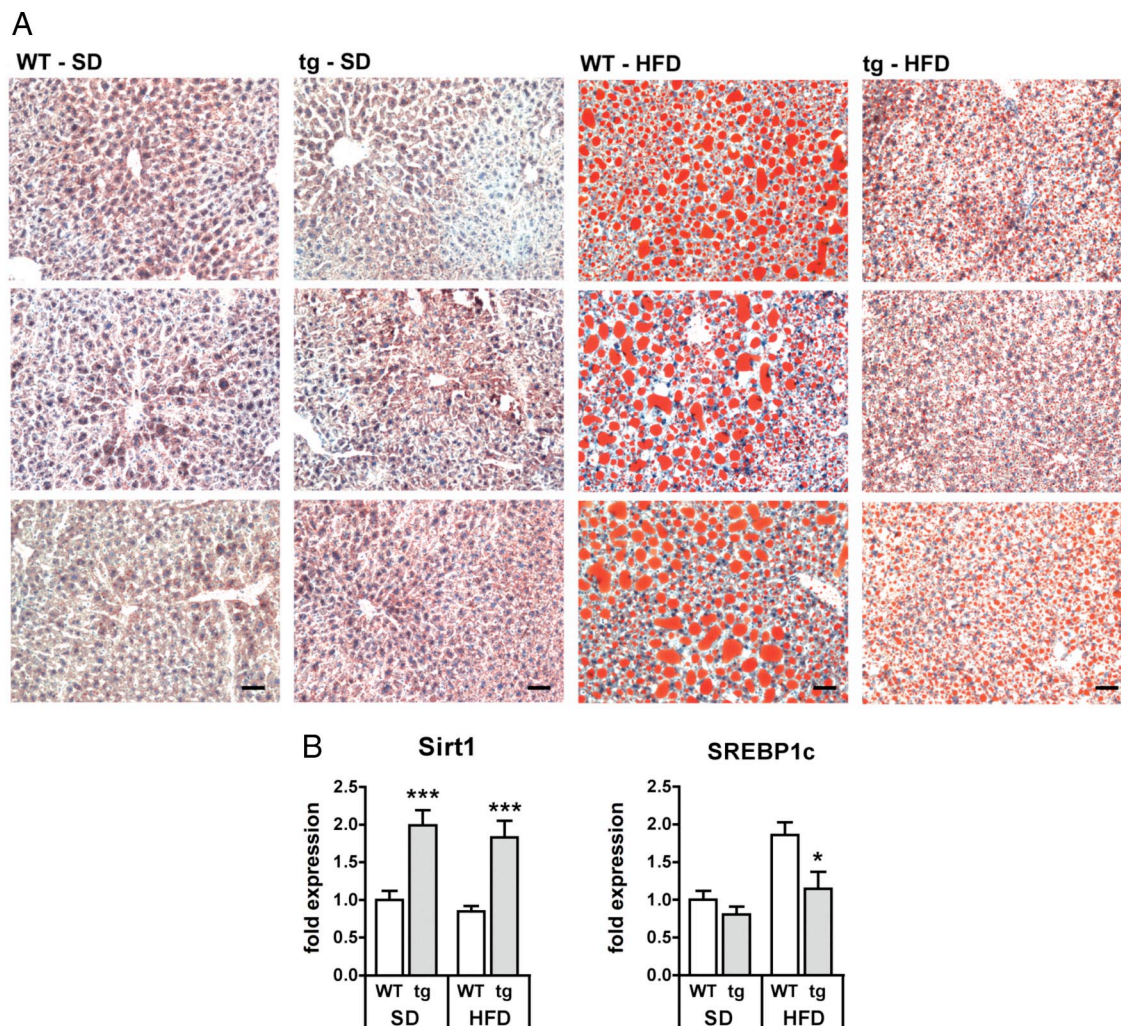


Fig. 3. Transgenic Sirt1 mice are protected from HFD-induced hepatosteatosis. (A) Oil red staining lipid droplets in frozen liver sections (3 per group) from both wild-type (WT) or transgenic (tg) mice on a standard diet (SD) or after high-fat diet (HFD) exposure for 19 weeks. (Scale bars, 50 μ m.) (B) Gene expression analysis (real-time PCR) of hepatic Sirt1 and the transcription factor SREBP1c. $n = 7-8$ per group; means \pm SEM; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

protected from NAFLD, showing a low number of lipid droplets with small diameters (Fig. 3A). A common feature of NAFLD is the deregulation of enzymes involved in fat metabolism, a process tightly controlled by a number of specific regulators, being particularly relevant the SREBP transcription factors (20). In agreement with the observed Sirt1-mediated protection from hepatosteatosis, we found that Sirt1 tg mice presented lower levels of SREBP1c mRNA in response to HFD (Fig. 3B). We conclude that Sirt1 protects from NAFLD.

Transgenic Sirt1 Mice Are Protected from HFD-Induced Hepatic Glucose Intolerance. Based on reports showing that NAFLD can also be a direct consequence of peripheral insulin resistance with an elevated transport of free fatty acids from adipose tissue to the liver (21), we next examined whether glucose tolerance and insulin resistance differed between genotypes at different ages and on different diets. After 8 weeks of diet exposure, overnight fasting plasma glucose levels were similar between genotypes on both SD and HFD (Table S1). In addition, insulin, cholesterol, and triglyceride plasma levels did not differ between genotypes and diets (Table S1). Chronic exposure to HFD for 18 weeks increased glucose, insulin, triglyceride, and cholesterol levels, and decreased free fatty acid levels, to the same extent in both WT and tg mice. In addition, blood glucose and free fatty acid levels under ad libitum

feeding conditions revealed no differences between genotypes on either SD or HFD (Table S1). To assess the impact of chronic HFD exposure on glucose homeostasis in more detail, the mice were subjected to a glucose tolerance test (GTT) after 7 weeks of SD or HFD exposure (Fig. 4A). Both WT and tg mice on SD were comparable throughout the study, indicating normal glucose tolerance. Intraperitoneal administration of glucose led to a more rapid increase of blood glucose levels in mice fed a HFD, indicating the expected HFD-induced systemic glucose intolerance in both genotypes. However, although peak values were similar for WT and tg mice on the HFD, the transgenic mice on HFD decreased their blood glucose levels more rapidly than WT controls on the same diet. Area-under-the-curve (AUC) values revealed a significantly better preserved glucose tolerance of tg mice on HFD compared with WT mice on HFD (Fig. 4A Right).

Because we observed substantial protection from hepatic lipid deposition by Sirt1 overexpression, we hypothesized a similar protective effect on hepatic glucose metabolism. We therefore performed a pyruvate tolerance test (PTT; Fig. 4B) in mice after 16 weeks of SD or HFD by intraperitoneally administering pyruvate, a precursor in the synthesis of glucose during gluconeogenesis, a process mainly localized in the liver and, to a smaller extent, the kidney. Subsequent measurement of circulating glucose levels at several time points after pyruvate injection in WT mice on HFD

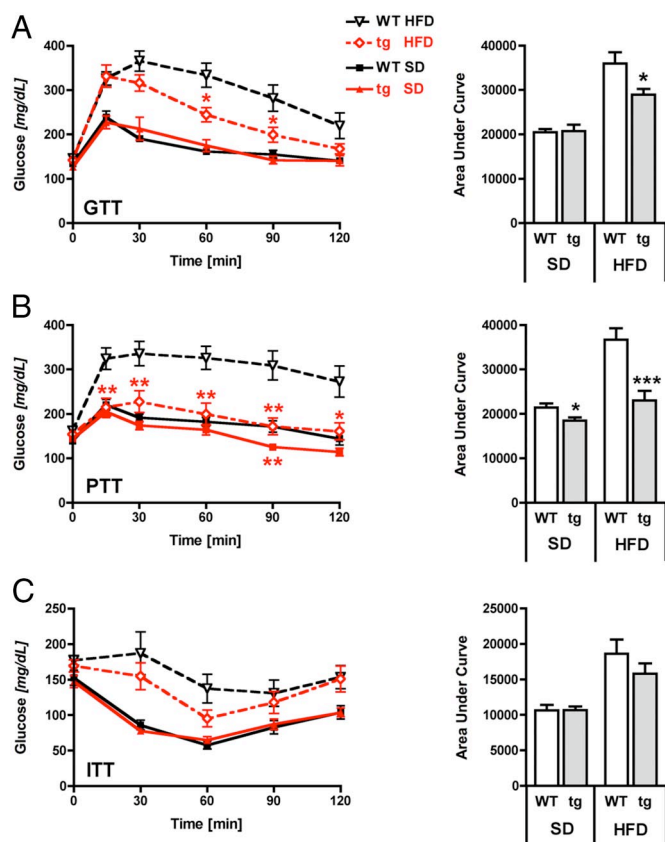


Fig. 4. Transgenic Sirt1 mice are protected from HFD-induced hepatic glucose intolerance. (A) Glucose tolerance test (GTT) after 7 weeks of diet exposure by using an i.p. dose of 2 g of glucose per kg of body weight. (B) Pyruvate tolerance test (PTT) after 16 weeks of diet exposure by using 2 g of pyruvate per kg of body weight. (C) Insulin tolerance test (ITT) after 13 weeks of diet exposure by using 0.75 IU/kg insulin. Curves of glucose levels (Left) and values of the area under the curve (Right). $n = 7-8$ per group; means \pm SEM; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

revealed a massive increase of blood glucose levels, which remained high throughout the 2-h study period, whereas blood glucose levels in tg mice on HFD remained significantly lower and in fact were comparable to those measured for WT mice on SD. In addition, overexpression of Sirt1 in mice on SD also decreased 90-min glucose levels (Fig. 4B Left) and AUC values (Fig. 4B Right) when compared with WT mice on SD.

In contrast to the glucose and pyruvate tolerance tests of tg mice on HFD that indicated a substantial protection from HFD-induced glucose intolerance, an insulin tolerance test (ITT) after prolonged exposure to HFD for 13 weeks showed only a tendency toward lower glucose levels in tg mice, which was nonsignificant for AUC values (Fig. 4C). These data indicate that Sirt1 overexpression does not significantly affect HFD-induced insulin resistance in young mice. All together, these data allow us to conclude that increased Sirt1 activity protects from HFD-induced hepatic glucose intolerance.

Transgenic Sirt1 Mice Are Protected from Hepatic Inflammation.

Exposure to a high-fat diet and diet-induced obesity lead to a chronic inflammatory reaction, which is believed to be critical for the development of glucose intolerance and insulin resistance (22). Accordingly, the expression of IL-6 and TNF α , two major proinflammatory cytokines, was significantly enhanced in livers of WT mice on a chronic HFD (Fig. 5A). Transgenic mice on HFD, however, still exhibited low levels of inflammatory markers, com-

parable to those seen in WT and tg mice on chow diet. IL-6 and TNF α are regulated by NF κ B, which in turn is activated by dietary lipids through the Toll-like receptor TLR4 (5). Interestingly, Sirt1 has been described to inhibit NF κ B activity (23–25). To evaluate whether NF κ B is down-modulated by Sirt1 in our mouse model, we performed the following *in vivo* and *in vitro* assays. Lipopolysaccharide (LPS) is an inflammatory agent that activates a wide range of responses partly mediated by TLR4 and NF κ B. In the liver, NF κ B plays an antiapoptotic role and provides protection against LPS-induced liver failure (26, 27). Consistent with Sirt1 tg mice having lower levels of NF κ B activity, Sirt1-tg mice on SD revealed a marked LPS hypersensitivity compared with WT controls (Fig. 5B). In addition, we examined whether NF κ B activation differs in mouse embryonic fibroblasts derived from tg and WT mice by using a reporter gene assay with luciferase under the transcriptional control of NF κ B responsive elements. Indeed, TNF α stimulation resulted in significantly lower activation of NF κ B in Sirt1-tg cells (2.8-fold) compared with WT cells (5-fold) (Fig. 5C). As mentioned above, the Sirt1 transgene also carries the adjacent gene Dnajc12 (see Fig. 1A). To rule out the possibility that the lower NF κ B activity observed in Sirt1 tg cells could be a consequence of an shRNA that significantly decreases Dnajc12 mRNA levels (10-fold inhibition) (Fig. S5A). We observed that Sirt1-tg cells exhibited lower NF κ B activity both in the absence or presence of shDnajc12 (Fig. S5B). These results implicate Sirt1, and not Dnajc12, as the gene responsible for the lower NF κ B activity of Sirt1-tg cells.

In addition to the reduced expression of inflammatory cytokines, the expression of the antioxidant proteins manganese superoxide dismutase (MnSOD) and the nuclear respiratory factor 1 (Nrf1), a master regulator in the protection from reactive oxygen species, were both increased in tg mice on both SD and HFD, compared with WT mice (Fig. 5D). Both genes, MnSOD and Nrf1, have been demonstrated to be induced by PGC1 α (28), which in turn is positively regulated by Sirt1 (10, 13). In summary, the overexpression of Sirt1 appears to protect tg mice from HFD-induced hepatic inflammation through decreasing the NF κ B-mediated induction of inflammatory cytokines, as well as by the activation of antioxidant proteins, possibly mediated by PGC1 α .

Discussion

We show here that modest overexpression of Sirtuin-1 (Sirt1) protects hepatic lipid and glucose metabolism from damage inflicted by high-fat diet. Sirt1 has been implicated in the molecular control of aging and cell proliferation, and more recently has also been involved in protection from metabolic syndrome. However, the proposed involvement of Sirt1 in protection from metabolic syndrome is based mostly on indirect evidence by using chemical activators of Sirt1. In particular, two studies have demonstrated beneficial effects of resveratrol on mice on a high-fat diet, including improved insulin sensitivity, lower steatosis, and increased survival (29, 30). More recently, Sirt1 activators unrelated to resveratrol have been shown to have beneficial effects on mitochondrial and metabolic function in obese rodents and offer potential for treating type 2 diabetes (14). However, although these studies compellingly argue in favor of the role of Sirt1 in protecting against high-fat diet, all of these Sirt1 activators may impinge on other members of the Sirtuin family as well as on a diverse range of pathways, as it is known to be the case of resveratrol (31).

To directly address the role of Sirt1 in protection from the detrimental metabolic consequences of high-fat diet exposure, we have engineered transgenic overexpression of Sirt1 in mice by introducing an additional transgenic copy of the full-length Sirt1 gene in the genome, which thereby remained under the control of its own promoter. Other Sirt1 transgenic mice reported express the transgene in restricted tissues, for example, endocrine pancreas, brain, or heart (32–35). Most recently, Bordone and colleagues (36)

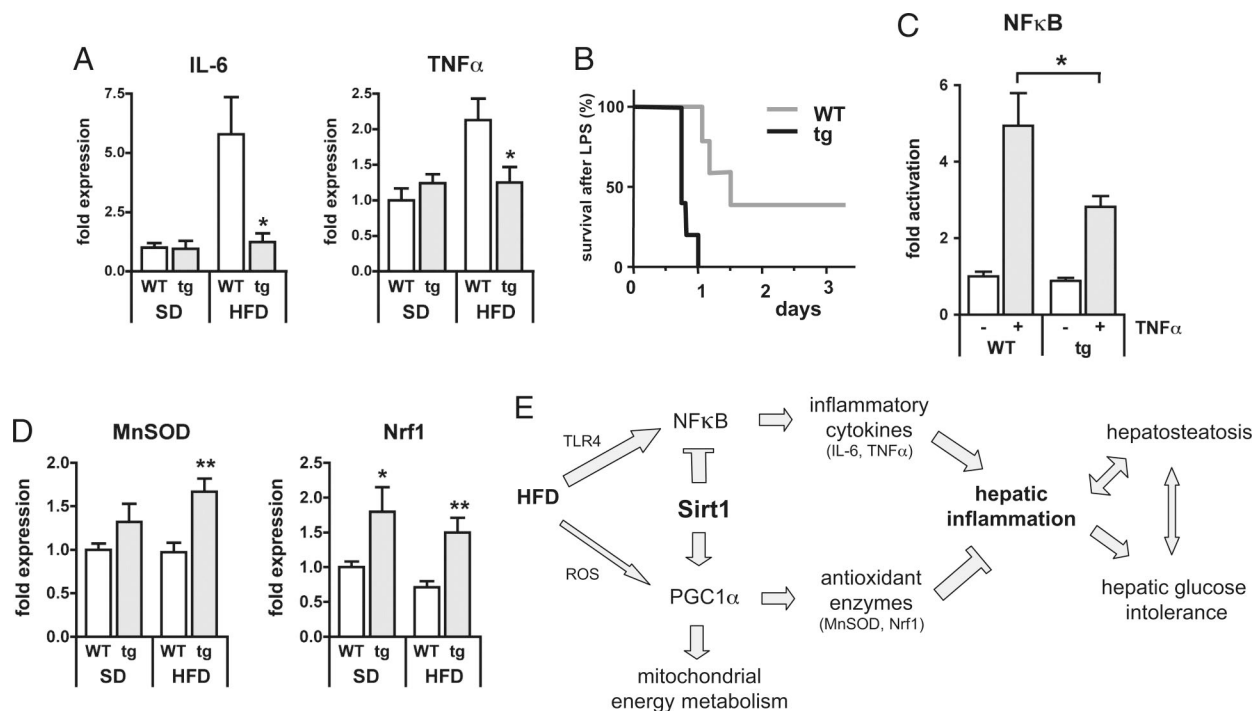


Fig. 5. Transgenic Sirt1 mice are protected from hepatic inflammation. (A) Gene expression analyses (real-time PCR) of the proinflammatory cytokines IL-6 and TNFα in livers of WT and tg mice on SD or HFD (19 weeks) ($n = 7-8$ per group; means \pm SEM; *, $P < 0.05$). (B) Kaplan–Meier plot of survival curves of WT and tg mice on SD after injection of lipopolysaccharide (LPS) ($n = 5$ per group). (C) Luciferase reporter gene assay of WT and tg mouse embryonic fibroblasts after transfection with a pNFκB-Luc reporter vector and stimulation with 10 ng/ml of TNFα. Luminescence was measured 6 h after TNFα incubation. ($n = 6-8$ per group; means \pm SEM; *, $P < 0.05$). (D) Gene expression analyses (real-time PCR) of the antioxidant proteins MnSOD and Nrf1 in livers of WT and tg mice on SD or HFD (19 weeks) ($n = 7-8$ per group; means \pm SEM; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). (E) Model of Sirt1 effects on known molecular pathways linking dietary lipids, hepatosteatosis, and hepatic glucose intolerance.

described a mouse model with overexpression of Sirt1 in a restricted number of tissues that include white and brown adipose tissue, but not in muscle and liver, which are relevant for the metabolic syndrome. In contrast to these mouse models, ours constitutes a model where Sirt1 is modestly overexpressed under its own promoter, thereby following the physiological pattern of expression, including metabolically relevant tissues, such as liver, muscle, and adipose tissue. These features make our Sirt1-tg mice an ideal model to explore the systemic effects of pharmacological interventions targeted to Sirt1.

Moderate Sirt1 overexpression in our mice led to a small increase in energy expenditure, which, however, did not translate into a significantly lower fat mass. In part, this is likely because of an unexpected increase in food intake, a phenomenon that has not been previously described as a consequence of Sirt1 overexpression. More interestingly, our present findings suggest that Sirt1 activators may hold promise for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). The pathogenesis of NAFLD is complex, but modulation of key transcription factors regulating hepatic lipid metabolism, such as sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1), has been proposed to carry great potential for the treatment of NAFLD (20). Interestingly, Sirt1 overexpression prevents up-regulation of SREBP1 on exposure to a high-fat diet. In addition, oxidative stress has been shown to play a causal role in the development of hepatosteatosis (37) and mice with a defect in hepatic Nrf1 expression develop hepatosteatosis as a result of hepatic oxidative stress (38). We here report an induction of Nrf1 in tg Sirt1 mice, as well as the induction of antioxidant enzymes such as MnSOD. Interestingly, an earlier report demonstrated that PGC1α, a well established target of Sirt1, activates this antioxidant program (28). These effects constitute plausible mechanisms for the protection from HFD-induced hepatosteatosis by Sirt1. Our ob-

servations warrant further study to evaluate Sirt1 as a potential target for the treatment of NAFLD.

Concomitant with the development of hepatosteatosis, hepatic inflammation is an established risk factor for the development of hepatic insulin resistance and glucose intolerance (39). Hepatic insulin resistance and glucose intolerance, in turn, can stimulate the development and progression of hepatosteatosis (40), thereby fueling and promoting a detrimental cycle that is believed to represent a key mechanistic component of the metabolic syndrome. Under fasting conditions, Sirt1 has a negative effect on insulin sensitivity and glucose tolerance (41). However, under fed conditions, activation of Sirt1 improves glucose homeostasis and insulin sensitivity (14, 29, 30, 42). Importantly, overexpression of Sirt1 in pancreatic β cells or adipose tissue improves glucose tolerance (32, 36). In our mice, moderate and systemic Sirt1 expression under its own promoter results in protection from HFD-induced glucose intolerance. The improved pyruvate tolerance of our transgenic mice on HFD suggests that the observed glucose tolerance is mainly due to a specific protection from hepatic insulin resistance, rather than to protection from systemic insulin resistance.

NFκB activity has previously been shown to be inhibited by Sirt1 (23–25). We confirmed such inhibition of NFκB in embryonic fibroblasts derived from Sirt1-tg mice. Hepatic NFκB signaling is activated by high-fat diet exposure and triggers insulin resistance (43), thereby linking inflammation with obesity-induced insulin resistance (44). Inhibition of NFκB activity by Sirt1 overexpression may—in conjunction with the activation of antioxidant proteins such as MnSOD and Nrf1—explain the prevention from hepatic inflammation, diet-induced glucose intolerance, and hepatosteatosis observed here (Fig. 5E).

In summary, moderate Sirt1 overexpression under control of its natural promoter in mice prevents HFD-induced glucose intoler-

ance and nonalcoholic fatty liver disease. Our results indicate that this effect may result, in part, from prevention of HFD-induced activation of the proinflammatory NF κ B pathway together with up-regulation of PGC1 α and its antioxidant targets such as MnSOD or Nrf1. Finally, the anti-inflammatory actions of Sirt1 open up aspects that could link Sirt1 with aging or cancer.

Methods

Transgenesis and Animal Experimentation. A large genomic DNA segment (174 kb) containing the murine Sirt1 gene and cloned into the BAC (Bacterial Artificial Chromosome) vector pBAC3.6 was obtained from CHORI (identification no. RP23-119G23) (<http://www.chori.org>). Pronuclei of fertilized oocytes, derived from intercrosses between (C57BL6 \times CBA)F₁ mice, were injected with \approx 2 pl of a DNA solution containing the linearized BAC (see *SI Methods*). Analysis of integrity and copy number was determined by standard Southern blot methods (see *SI Methods*). Sirt1-tg mice were backcrossed for four generations with pure C57BL6 mice; in this manner, all of the mice used in this study share a genetic background that is 97% C57BL6. Sirt1-heterozygous mice were kindly obtained from Fred Alt, Harvard Medical School (17). Mice were fed either with a standard chow diet (Harlan Teklad LM-485), or with a high-fat diet (Research Diets 12451, 45% kJ from fat) starting when the mice were \approx 2 months old and for a total of 19 additional weeks. To assess LPS susceptibility in each genotype, mice were injected i.p. with 20 mg/kg of *Escherichia coli*-derived LPS serotype 0111:B4 (Sigma). All studies were approved by and performed according to the ethical guidelines of the University of Cincinnati and the Spanish National Cancer Research Center (CNIO).

DNA, RNA, and Protein Analyses. Southern and Northern blot analyses were performed using standard procedures (probes and primers are detailed in [Table](#)

[S2](#)). Western blot analyses were performed following standard procedures. For detection of Sirt1, we used rabbit polyclonal antibody ab12193 (AbCam), working dilution 1:2,000; and for β -actin, we used monoclonal antibody AC-15 (Sigma), 1:5,000.

Mouse Embryonic Fibroblasts. Luciferase assays were done by using Lipofectamine LTX and PLUS reagent (Invitrogen) for the transfections. We used pNF κ BLuc (Clontech) reporter vector and E1f α -Renilla vector as transfection control. TNF α (Promega) was added at 10 ng/ml and luminescence was measured 6 h later by using a Glomax luminometer (Promega).

Metabolic Phenotyping. Tail blood was collected 2 h after the onset of the light phase either after an overnight fast, or in ad libitum fed mice by using EDTA-coated Microvette tubes (Sarstedt), and immediately chilled on ice. Determinations were performed by using standard methods (see *SI Methods*). Metabolic performance and activity were studied by using an automated combined indirect calorimetry system (TSE Systems GmbH) and a multidimensional infrared light beam system (see *SI Methods*). Glucose, insulin, and pyruvate tolerance tests were performed according to standard procedures (see *SI Methods*).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Fred Alt for providing us with Sirt1-null mice, Dave D. D'Alessio for critically reviewing the manuscript, and Javier Martin, Maribel Muñoz, Gema Iglesias, and Erin Grant for excellent technical assistance. D.H. is supported by a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Health and by the "Francisco Cobos" Foundation. S.V. is supported by a "Ramon y Cajal" contract from the Spanish Ministry of Education (MEC). Research at the laboratory of M.S. is funded by the Spanish National Cancer Research Center and by grants from the MEC, the European Union (INTACT and PROTEOMAGE), and the "Marcelino Botin" Foundation. Research at the Obesity Research Center is funded by National Institutes of Health Grants NIDDK59630, NIDDK69987, and NIDDK56863 (to M.H.T.).

- Foster-Schubert KE, Cummings DE (2006) Emerging therapeutic strategies for obesity. *Endocr Rev* 27:779–793.
- Cooke D, Bloom S (2006) The obesity pipeline: Current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nat Rev Drug Discov* 5:919–931.
- Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S (2007) The hormonal control of food intake. *Cell* 129:251–262.
- Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM (2007) The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 132:2087–2102.
- Shi H, et al. (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015–3025.
- Suganami T, et al. (2007) Role of the Toll-like receptor 4/NF κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:84–91.
- Tsukumo DM, et al. (2007) Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1986–1998.
- Tschop M, Thomas G (2006) Fat fuels insulin resistance through Toll-like receptors. *Nat Med* 12:1359–1361.
- Picard F, et al. (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature* 429:771–776.
- Rodgers JT, et al. (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 434:113–118.
- Guarente L (2006) Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* 444:868–874.
- Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J (2007) Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol* 21:1745–1755.
- Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P (2007) Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways. *FEBS Lett* 582:46–53.
- Milne JC, et al. (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450:712–716.
- Giraldo P, Montoliu L (2001) Size matters: Use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res* 10:83–103.
- Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L (2006) The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* 63:2560–2570.
- Cheng HL, et al. (2003) Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10794–10799.
- Perlemuter G, Bigorgne A, Cassard-Doulcier AM, Naveau S (2007) Nonalcoholic fatty liver disease: From pathogenesis to patient care. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:458–469.
- Ahmed MH, Byrne CD (2007) Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Drug Discov Today* 12:740–747.
- Medina J, Fernandez-Salazar LI, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R (2004) Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 27:2057–2066.
- Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860–867.
- Yeung F, et al. (2004) Modulation of NF κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23:2369–2380.
- Gao F, Cheng J, Shi T, Yeh ET (2006) Neddylation of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NF κ B-dependent transcription. *Nat Cell Biol* 8:1171–1177.
- Yang SR, et al. (2007) Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF κ B in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: Implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol* 292:L567–L576.
- Gadjeva M, et al. (2004) A role for NF κ B subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol* 173:5786–5793.
- Kisseleva T, et al. (2006) NF κ B regulation of endothelial cell function during LPS-induced toxemia and cancer. *J Clin Invest* 116:2955–2963.
- St-Pierre J, et al. (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127:397–408.
- Baur JA, et al. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337–342.
- Lagouge M, et al. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127:1109–1122.
- Baur JA, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493–506.
- Moynihan KA, et al. (2005) Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2:105–117.
- Ramsey KM, Mills KF, Satoh A, Imai SI (2008) Age-associated loss of Sirt1-mediated enhancement of glucose-stimulated insulin secretion in BESTO mice. *Aging Cell* 7:78–88.
- Qin W, et al. (2006) Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem* 281:21745–21754.
- Alcendor RR, et al. (2007) Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 100:1512–1521.
- Bordone L, et al. (2007) SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 6:759–767.
- Matsuzawa N, et al. (2007) Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 46:1392–1403.
- Xu Z, et al. (2005) Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4120–4125.
- Shoelson SE, Herrero L, Naaz A (2007) Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132:2169–2180.
- Ota T, et al. (2007) Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 132:282–293.
- Rodgers JT, Puigserver P (2007) Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12861–12866.
- Sun C, et al. (2007) SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 6:307–319.
- Cai D, et al. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF κ B. *Nat Med* 11:183–190.
- Arkan MC, et al. (2005) IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11:191–198.

Supporting Information

Pfluger et al. 10.1073/pnas.0802917105

SI Methods

Generation of Transgenic Mice and Animal Experimentation. A large genomic DNA segment (174 kb) containing the murine Sirt1 gene and cloned into the Bacterial Artificial Chromosome (BAC) vector pBAC3.6 was obtained from CHORI (identification no. RP23-119G23) (<http://www.chori.org>). The terminal sequences of the insert were confirmed with primers complementary to the insert-flanking elements of the vector, namely, SP6-BAC 5'-atttagtgacactatagaat-3' and T7-BAC 5'-taatacgactcactatagg-3'. The integrity of the BAC was further confirmed by digestion with several restriction enzymes and Southern blot analysis (supporting information (SI) Fig. S1). For transgenesis, the Sirt1-containing BAC was digested with *Pi-SceI*, thus linearizing the BAC in the vector at a position adjacent to the T7 end of the genomic insert (the T7 end is upstream of the Sirt1 gene, at the *Ctnna3* gene; see Fig. 1A). Pronuclei of fertilized oocytes, derived from intercrosses between (C57BL6 × CBA)F₁ mice, were injected with ≈2 pl of a DNA solution containing the linearized BAC. The resulting offspring was analyzed for the presence of the transgene by using PCR reactions that amplify either the vector (primers pBAC-F 5'-agatagttcaccgggtgagaa-3' and pBAC-R 5'-ttcgtcgaagagtatctgtg-3'), or the T7 insert-vector junction (primers T7-BAC, see above, and T7-tg 5'-agcttcttcacacacatggagtt-3'). One founder was identified that overexpressed Sirt1, abbreviated here as Sirt1-tg. The number of integrated BAC copies was determined in two ways: first, quantification of Southern blot analysis against Sirt1 gene indicated the presence of a single transgenic copy in addition to the two endogenous alleles (Fig. S2); and, second, Southern blot analysis against a terminal fragment of the BAC genomic insert indicated the presence of a single transgene-genome junction (data not shown), again supporting the presence of a one transgenic copy. This founder Sirt1 [$+/+;tg$] mouse was backcrossed for four generations with pure C57BL6 mice; in this manner, all of the mice used in this study share a genetic background that is 97% C57BL6. Mice were housed at the pathogen-free barrier areas of the Spanish National Cancer Research Center (CNIO) and at the University of Cincinnati. Sirt1-heterozygous mice were kindly obtained from Fred Alt, Harvard Medical School.

Mice were fed either with a standard chow diet (Harlan Teklad LM-485), or with a high-fat diet (Research Diets 12451, 45% kJ from fat) starting when the mice were ≈2 months old and for a total of 19 additional weeks. Whole-body composition (fat and lean mass) was measured by using well established quantitative NMR technology (EchoMRI). To assess LPS susceptibility in each genotype, mice were injected i.p. with 20 mg/kg of *Escherichia coli*-derived LPS serotype 0111:B4 (Sigma) and then monitored every 8 h for a 72-h period. All studies were approved by and performed according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) of the University of Cincinnati and the Guidelines for Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research at the CNIO.

DNA, RNA, and Protein Analyses. Southern and Northern blot analyses were performed by using standard procedures. The probes and primers used to obtain the probes are explained in the corresponding figure legends. Real-time PCRs to validate for candidate genes and for the ribosomal housekeeping gene L-32 were performed on a Bio-Rad iCycler by using iQ SybrGreen Supermix (Bio-Rad). Sequences of primers are listed in (Table

S2). Western blot analyses were performed by standard procedures. For detection of Sirt1, we used rabbit polyclonal antibody ab12193 (AbCam), working dilution 1:2,000; and for β -actin, we used monoclonal antibody AC-15 (Sigma), 1:5,000.

Mouse Embryonic Fibroblasts. Luciferase assays were done by using Lipofectamine LTX and PLUS reagent (Invitrogen) for the transfections. We used pNF κ BLuc (Clontech) reporter vector and Elfa-Renilla vector as transfection control. TNF α (Promega) was added at 10 ng/ml and luminescence was measured 6 h later by using a Glomax luminometer (Promega).

Blood Parameters. Tail blood was collected 2 h after the onset of the light phase either after an overnight fast, or in ad libitum-fed mice by using EDTA-coated Microvette tubes (Sarstedt), and immediately chilled on ice. Glucose levels were determined from whole blood at the beginning of each blood collection by using the TheraSense Freestyle glucometer. Plasma insulin levels were quantified by using a RIA from Linco (Sensitive Rat Insulin RIA, Linco Research). Nonesterified fatty acid levels (NEFAs) were measured by using an enzymatic assay kit from Wako (NEFA C, Wako). Plasma cholesterol levels were determined by using Infinity Cholesterol reagent, and plasma triglycerides were quantified by using Infinity Triglyceride reagent (Thermo Electron). Plasma leptin and adiponectin levels were measured by using the Quantikine mouse leptin and adiponectin immunoassays, respectively (R&D Systems). All assays were performed according to the manufacturer's instructions.

Metabolic Phenotyping. Metabolic performance (energy intake and energy expenditure) and home-cage activity were studied by using an automated combined indirect calorimetry system (TSE Systems GmbH). Before the experiment, the mice were allowed to acclimatize to the air-tight cages for 16 h, and subsequently oxygen consumption and CO₂ production were measured every 45 min for a total of four light and four dark phases (100 h). The respiratory quotient (RQ; VCO₂/VO₂) and energy expenditure were calculated by using standard in-house software. Simultaneously, intake of food and water was determined continuously by integration of scales into the sealed-cage environment. In parallel, home-cage locomotor activity was determined by using a multidimensional infrared light beam system with beams installed on cage-bottom and cage-top levels and activity being expressed as beam breaks. Stationary motor activity (fidgeting) was defined as consecutive breaks of one single light beam, and ambulatory movement as consecutive breaks of two different light beams.

For the glucose tolerance test (GTT), WT and tg mice on both diets were subjected to 6 h of fasting and injected i.p. with 2 g of glucose per kg of body weight. The insulin tolerance test (ITT) was performed similarly, with an initial fasting for 6 h, and subsequent i.p. injection of 0.75 IU insulin per kg of body weight (Eli Lilly and Co., Humalog Insulin). The pyruvate tolerance test (PTT) was performed by i.p. injection of 2 g of pyruvate per kg of body weight, after an initial 6-h fast. In all tests, tail blood glucose levels were measured with a glucometer (TheraSense Freestyle) at the indicated times after injection.

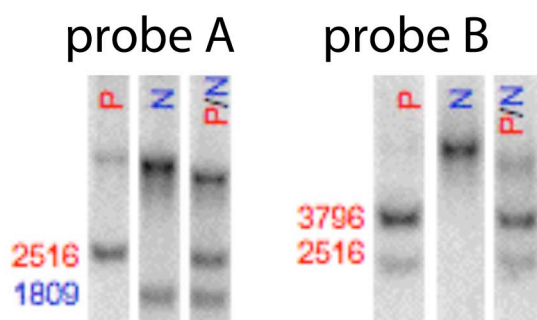
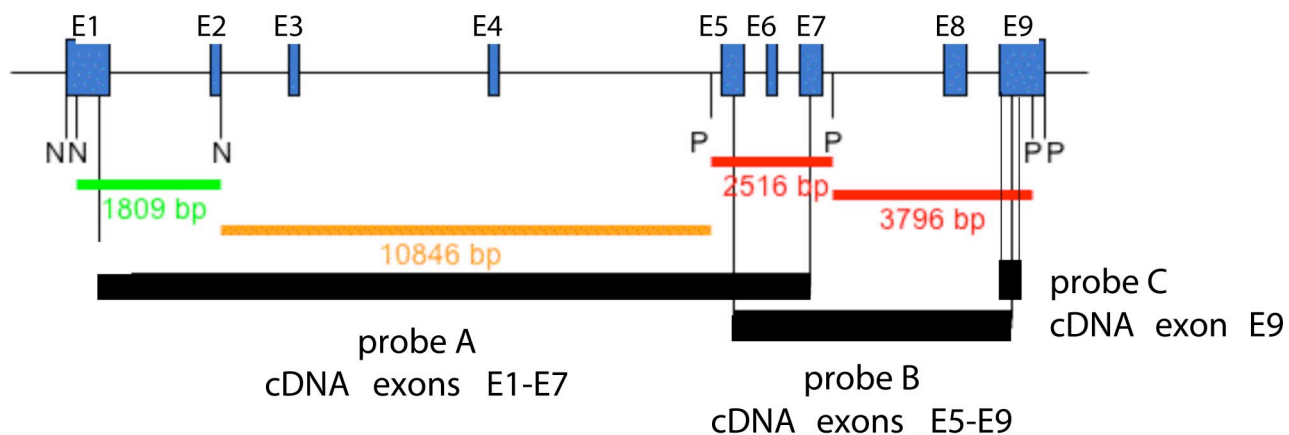


Fig. S1. Integrity of the genomic insert present in the Sirt1 BAC. The Sirt1-BAC DNA prepared from bacteria was digested with restriction enzymes PstI (P) and NotI (N), alone or in combination, and then probed with the indicated probes obtained from Sirt1 cDNA. The results of Southern blot analysis are shown in the bottom part. The probes are derived from Sirt1 cDNA, as indicated in the top scheme, together with the predicted DNA fragments generated by PstI and NotI. The primers used to obtain the probes are listed in [Table S2](#).

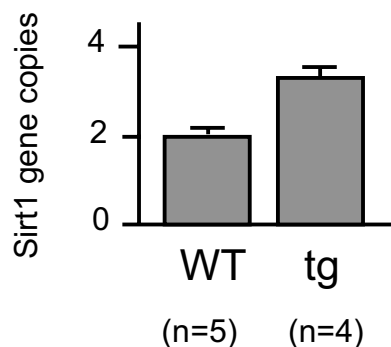


Fig. S2. Gene copy number in Sirt1-tg mice. The number of integrated BAC copies was determined in two ways: first, quantification of Southern blot analysis against Sirt1 gene indicated the presence of a single transgenic copy in addition to the two endogenous alleles (shown in this figure); and, second, Southern blot analysis against a terminal fragment of the BAC genomic insert indicated the presence of a single transgene-genome junction (data not shown), again supporting the presence of one transgenic copy. The Southern blot analysis shown here was performed by using genomic DNA from the tail tips, digested with restriction enzyme EcoRI, and probed with a cDNA fragment of Sirt1 corresponding to exon 9 (see probe C in Fig. S1). To control for DNA loading, membranes were subsequently reprobed with a probe that detects Igf1. (*Upper*) One representative example. (*Lower*) Quantification of wild-type ($n = 5$) and transgenic ($n = 4$) mice. Quantification indicates that transgenic mice have a single additional copy of the Sirt1 gene (WT mice = 2 copies; tg mice = 3 copies).

A

Sirt1(+/-;tg) x Sirt1(+/-) offspring		
Sirt1 genotype	expected Mendelian ratio (%)	observed ratio (%) (n=50)
(+/+)	12.5	16
(+/-)	25	30
(-/-)	12.5	6
(+/+;tg)	12.5	14
(+/-;tg)	25	22
(-/-;tg)	12.5	12

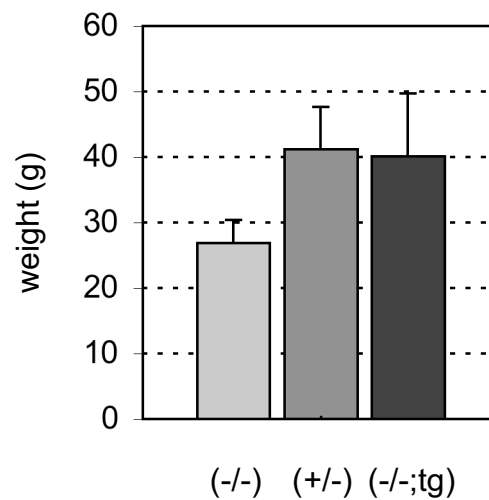
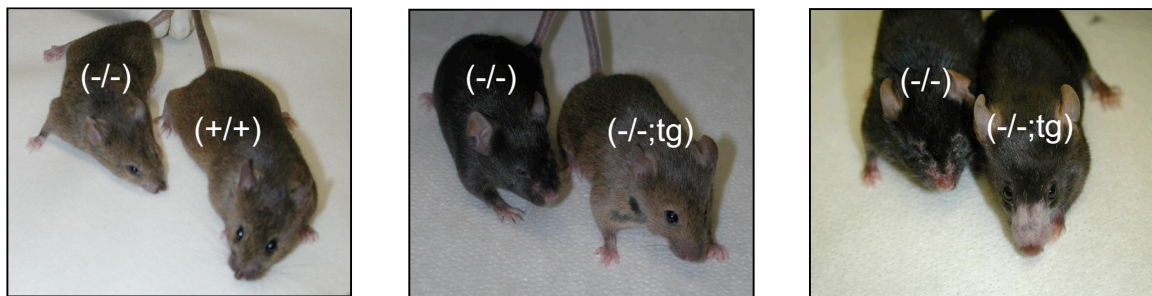
B**C**

Fig. S3. Genetic rescue of Sirt1-null phenotypes by the Sirt1-tg allele. (A) The partially penetrant perinatal lethality of Sirt1 deficiency was rescued by the Sirt1-tg allele. Sirt1(-/-;tg) mice were born with the expected Mendelian ratio, whereas Sirt1(-/-) mice were born at a 50% ratio compared with the expected Mendelian proportion. (B) Sirt1(-/-;tg) mice had a body weight similar to Sirt1(+/-) mice (all mice of 8–12 months of age), which is in agreement with the fact that both genotypes carry a single functional copy of the Sirt1 gene. In contrast, viable Sirt1(-/-) mice had a lower body weight. (C) Sirt1(-/-) mice have noticeably small eyes (microphthalmia), whereas Sirt1(-/-;tg) mice have normally sized eyes, comparable to Sirt1(+/+) controls.

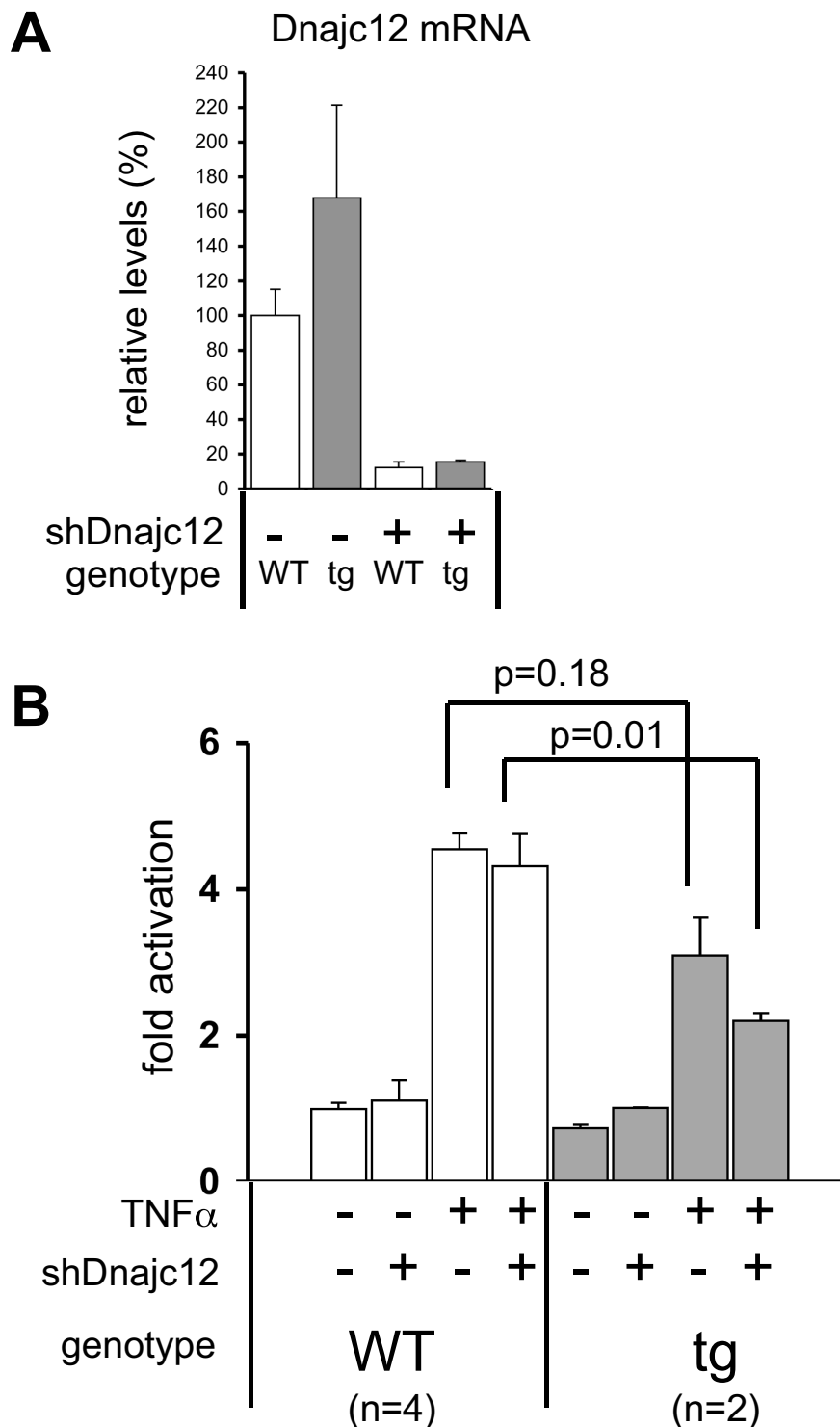


Fig. S5. Lack of involvement of Dnajc12 in the lower NF κ B activity of Sirt1-tg cells. (A) Levels of Dnajc12 in wt and tg Sirt1 MEFs in the absence or presence of an shRNA against Dnajc12. The shRNA against Dnajc12 (5'-gtgtagttttattcaata-3') was designed by using the "iRNAi" software and it was cloned into pRetro-Super vector (shDnajc12). Its activity was confirmed by retroviral infection of primary MEFs ($n = 4$ for each genotype and condition) with the empty vector or with the shDnajc12 vector. The primers used for RT-PCR detection of Dnajc12 were: Dnajc12-F 5'-tactacgccttgctgggatg-3'; Dnajc12-R 5'-agtctcaggatgctgtgcgg-3'. (B) Luciferase reporter gene assay of WT and tg mouse embryonic fibroblasts after transfection with a pNF κ B-Luc reporter vector and stimulation with 10 ng/ml TNF α in the presence of a control shRNA (shGFP, indicated as "-" in the figure) or of a shRNA against Dnajc12. Luminescence was measured 6 h after TNF α incubation. Sirt1-tg cells showed a lower NF κ B activity regardless of the absence or presence of shDnajc12. Similar results were obtained when shDnajc12 was introduced by retroviral infection (data not shown).

Table S1. Plasma analyses

	SD				HFD				Units
	WT		tg		WT		tg		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	
Fast. Glucose 8 wks	134.0	± 5.6	125.0	± 6.0	146.0	± 8.0	142.0	± 8.7	mg/dL
Fast. Glucose 18 wks	115.6	± 3.8	112.0	± 4.0	125.9	± 9.4	135.0	± 7.6	mg/dL
Ad lib Glucose 18 wks	140.8	± 8.7	140.6	± 9.0	145.5	± 6.9	140.1	± 6.4	mg/dL
Fast. Insulin 8 wks	76.9	± 6.2	92.3	± 8.7	161.8	± 21.7	141.2	± 13.8	pg/ml
Fast. Insulin 18 wks	56.0	± 5.4	68.8	± 1.7	115.8	± 11.2	149.4	± 47.4	pg/ml
Fast. Cholesterol 8 wks	58.8	± 1.3	61.7	± 3.8	88.1	± 6.0	85.4	± 5.8	mg/dL
Fast. Cholesterol 18 wks	124.2	± 6.2	125.6	± 5.2	186.8	± 16.6	176.1	± 13.3	mg/dL
Fast. Triglycerides 8 wks	59.7	± 4.0	66.7	± 3.8	97.6	± 9.5	80.9	± 10.6	mg/dL
Fast. Triglycerides 18 wks	53.6	± 3.5	68.2	± 4.8*	73.7	± 5.8	74.3	± 6.7	mg/dL
Ad lib FFA 18 wks	0.141	± 0.030	0.152	± 0.043	0.115	± 0.027	0.132	± 0.033	mM
Fast. FFA 18 wks	0.516	± 0.092	0.497	± 0.041	0.379	± 0.033	0.377	± 0.046	mM
Ad lib Leptin 20 wks	5.44	± 0.77	5.42	± 1.12	68.2	± 10.0	49.4	± 11.1	ng/ml
Ad lib Adiponectin 20 wks	4.70	± 0.13	4.61	± 0.22	5.35	± 0.25	5.24	± 0.34	μg/ml

FFA, free fatty acids; means ± SEM, $n = 7-8$, *, $P < 0.05$

ARTICLE

Received 2 Nov 2009 | Accepted 25 Feb 2010 | Published 12 Apr 2010

DOI: 10.1038/1001

Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer

Daniel Herranz¹, Maribel Muñoz-Martin¹, Marta Cañamero², Francisca Mulero³, Barbara Martinez-Pastor⁴, Oscar Fernandez-Capetillo⁴ & Manuel Serrano¹

Genetic overexpression of protein deacetylase Sir2 increases longevity in a variety of lower organisms, and this has prompted interest in the effects of its closest mammalian homologue, Sirt1, on ageing and cancer. We have generated transgenic mice moderately overexpressing Sirt1 under its own regulatory elements (Sirt1-tg). Old Sirt1-tg mice present lower levels of DNA damage, decreased expression of the ageing-associated gene p16^{Ink4a}, a better general health and fewer spontaneous carcinomas and sarcomas. These effects, however, were not sufficiently potent to affect longevity. To further extend these observations, we developed a metabolic syndrome-associated liver cancer model in which wild-type mice develop multiple carcinomas. Sirt1-tg mice show a reduced susceptibility to liver cancer and exhibit improved hepatic protection from both DNA damage and metabolic damage. Together, these results provide direct proof of the antiageing activity of Sirt1 in mammals and of its tumour suppression activity in ageing- and metabolic syndrome-associated cancer.

¹ Tumor Suppression Group, Spanish National Cancer Research Center, 3 Melchor Fernandez Almagro Street, Madrid E-28029, Spain. ² Comparative Pathology Unit, Spanish National Cancer Research Center, 3 Melchor Fernandez Almagro Street, Madrid E-28029, Spain. ³ Molecular Imaging Unit, Spanish National Cancer Research Center, 3 Melchor Fernandez Almagro Street, Madrid E-28029, Spain. ⁴ Genomic Instability Group, Spanish National Cancer Research Center, 3 Melchor Fernandez Almagro Street, Madrid E-28029, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.S. (email: mserrano@cni.es).

Overexpression of protein deacetylase Sir2 in yeasts, flies and worms has the remarkable effect of extending longevity^{1,2}. Mammals have evolved a family of Sir2-related proteins known as sirtuins and composed of seven members (Sirt1–7), of which Sirt1 is the closest homologue to Sir2². However, little is known at present about the impact of mammalian Sirt1 on ageing³. Regarding cancer, available genetic evidence supports a tumour-suppressor role of Sirt1⁴. In particular, decreased Sirt1 activity accelerated the tumour-prone phenotype of p53-heterozygous mice⁵ and, reciprocally, overexpression of Sirt1 in lymphocytes delayed the development of radiation-induced lymphomas in p53-heterozygous mice⁶. Moreover, Sirt1 binds and deacetylates β -catenin, thus cancelling its oncogenic transcriptional activity and decreasing intestinal tumour development⁷. Although the above results are of obvious importance, the impact of systemic Sirt1 upregulation on ageing and on ageing-associated cancer remains to be determined. This is particularly relevant given the ongoing efforts to develop drugs that stimulate Sirt1 activity, including resveratrol and SRT1720^{8–10}. Regarding these latter compounds, it is controversial whether they activate Sirt1 directly^{8,9,11,12}. Alternatively, resveratrol may upregulate Sirt1 through indirect mechanisms that could involve AMPK^{13,14}.

It has been previously reported by others and us that transgenic mice systemically overexpressing Sirt1 (~3-fold) are protected from the physiological damage produced by a high-fat diet (HFD)^{15,16}. These observations are further reinforced by the phenotype of mice deficient in Dbp1, a negative regulator of Sirt1, which also shows systemic activation of Sirt1 and protection from HFD-induced damage¹⁷. At a molecular level, protection against HFD has been reported to reflect the activity of Sirt1 as a negative regulator of nuclear factor- κ B (NF- κ B)^{15,17} and as a positive effector of PGC1 α ¹⁵ and FoxO1¹⁶. Chronic exposure to high levels of dietary fat results in a multi-systemic deterioration known as metabolic syndrome, which is characterized by insulin resistance, liver steatosis, atherogenic cardiovascular disease, dyslipidaemia and systemic inflammation, which may lead to fatal diseases such as liver cancer and heart failure^{18,19}. Given the prevalence of metabolic syndrome in the adult and aged human population²⁰, it is of interest to determine the impact of Sirt1 upregulation on metabolic syndrome-associated cancer.

In this study, we examine the ageing and longevity of Sirt1-tg mice, as well as their susceptibility to spontaneous cancer and to liver cancer associated with metabolic syndrome. Our results indicate that Sirt1 exerts antiageing activity in mammals, although this effect is not sufficiently potent to extend longevity, at least at the levels of overexpression achieved in our mice. Sirt1-tg mice are protected from the development of ageing-associated diseases such as glucose intolerance, osteoporosis and cancer. Moreover, Sirt1 provides a strong protection against liver cancer development in the context of metabolic syndrome.

Results

Normal longevity and decreased spontaneous cancer. To evaluate the impact of Sirt1 on mammalian ageing, we analysed two independent lines of Sirt1 transgenic mice carrying different, but overlapping genomic DNA segments (Supplementary Fig. S1a). These two lines, named here as Sirt1-tgA¹⁵ and Sirt1-tgB, overexpress ~3-fold Sirt1 mRNA across all tissues tested (Supplementary Fig. S1b), and present detectably higher levels of Sirt1 protein (Supplementary Fig. S2a–c), as well as an increase in hepatic Sirt1 activity measured by the lower levels of acetylated lysine 310 of p65RelA (Supplementary Fig. S2c), a known target of Sirt1 deacetylase activity²¹. In agreement with their similar levels of Sirt1 upregulation, both transgenic lines displayed similar phenotypes regarding protection from HFD, such as, decreased adipose tissue inflammation (Supplementary Fig. S3a), improved glucose tolerance (Supplementary Fig. S3b and ref. 15), and protection from hepatic steatosis (Supplementary Fig. S3c and ref. 15), as

well as increased sensitivity to lipopolysaccharide shock under standard diet (Supplementary Fig. S4 and ref. 15).

To determine the impact of Sirt1 upregulation on longevity, we followed up cohorts of the two lines, together with their corresponding wild-type (WT) controls. All cohorts had the same uniform but hybrid genetic background (C57BL6/CBA 87.5:12.5%). The corresponding survival curves are represented by either separating the two lines or pooling them together. Pooling allowed us to achieve a cohort size per genotype and sex of $n > 40$, which provides sufficient statistical power to reliably detect differences greater than 10% in mean lifespan²². The survival curves of Sirt1-tg(A + B) and WT(A + B) were indistinguishable for both male and female mice (Fig. 1a). When male and female mice were grouped together, the number of WT mice and tg mice was $n > 100$ and, again, no differences were detected in survival (Fig. 1a). Moreover, no significant differences were found between Sirt1-tg mice and their corresponding WT controls when each line was analyzed separately (Fig. 1a). We conclude that systemic threefold upregulation of Sirt1 has no detectable impact, neither detrimental nor beneficial, on mouse longevity.

Detailed histopathological analyses of old moribund mice revealed a lower incidence of malignant tumours in Sirt1-tg mice, compared with WT mice of both lines (Fig. 1b). Remarkably, the suppressive effect of Sirt1 on malignant tumours was restricted to carcinomas and sarcomas (mostly osteosarcomas), whereas it had no effect on the incidence of lymphomas and histiocytic lymphomas (the latter also known as histiocytic sarcomas) (Fig. 1c). It is important to mention that most spontaneous carcinomas and sarcomas were in general of small size (as was the case of liver or lung carcinomas) or affected non-vital organs (such as Harderian gland carcinomas in the eyes or osteosarcomas in the limbs). Therefore, despite their malignancy, most carcinomas and sarcomas were at a stage of dissemination that is unlikely to be the primary cause of death. This is in contrast to spontaneous lymphomas, which had similar incidences in WT and tg mice, and were highly aggressive and the likely cause of death. In summary, these results indicate that Sirt1 upregulation provides protection from spontaneous carcinomas and sarcomas, but not from spontaneous lymphomas. Conceivably, the lack of effect of Sirt1 on spontaneous lymphomas could mask a putative effect of Sirt1 on longevity.

Improved healthy ageing. To examine the impact of Sirt1 on ageing, we began by examining a physiological parameter related to metabolic syndrome, namely, ageing-associated glucose intolerance²³. Young (3 months old) WT and Sirt1-tg mice under a standard diet showed similar performance in glucose-tolerance tests^{15,16} (see also Supplementary Fig. S3b). Interestingly, at 1.5 years of age, WT mice already showed evidence of glucose intolerance, whereas transgenic Sirt1 mice preserved a significantly better glucose uptake (Fig. 2a). These results indicate that Sirt1 confers protection against ageing-associated metabolic damage under standard diet and, together with previous data on mice under an HFD^{15–17}, reinforce and extend the concept that Sirt1 is a general protector against metabolic damage.

Another common feature of ageing is the development of osteoporosis, a process that can be promoted by NF- κ B^{24,25} the activity of which is increased during ageing²⁶. In agreement with the reported ability of Sirt1 to inhibit NF- κ B^{15,17,21}, we observed that Sirt1-tg mice preserved normal bone density values at old age (2.5 years), whereas WT mice showed a significant decline in bone density at this age (Fig. 2b). Additional indicators of fitness at old age were obtained by measuring skin regeneration (wound-healing assay, Fig. 2c) and neuromuscular coordination (tightrope assay, Fig. 2d), both of which suggested a better performance by Sirt1-tgA mice (no effect at this level was detected in Sirt1-tgB mice).

To evaluate ageing at a molecular level, we measured two well-established markers of ageing, namely, the levels of p16^{Ink4a} mRNA²⁷ and the accumulation of nuclear foci of DNA damage proteins^{28,29}.

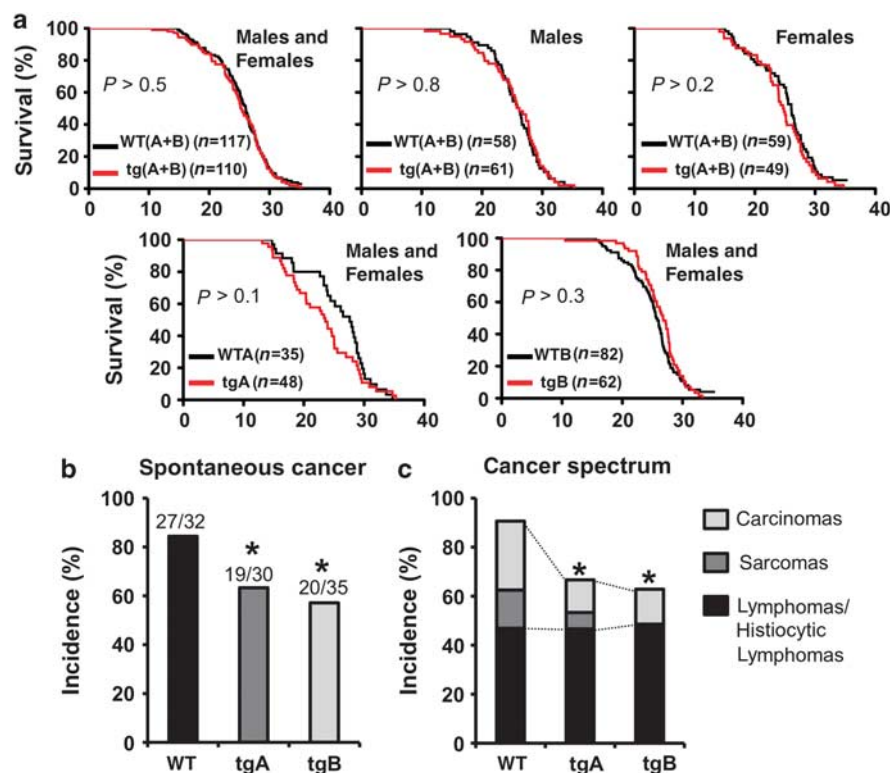


Figure 1 | Normal lifespan but enhanced cancer protection in Sirt1-tg mice. (a) Survival of cohorts of mice of the indicated genotypes. Log-rank tests indicated that Sirt1-tg mice were not statistically different from WT mice ($P > 0.05$). (b) Spontaneous cancer incidence. Statistical significance versus WT mice was calculated using Fisher's exact test: * $P < 0.05$. (c) Cancer spectrum. Statistical analysis refers to the combined incidence of carcinomas and sarcomas versus WT mice using Fisher's exact test: * $P < 0.05$.

In the case of p16^{Ink4a}, its transcript levels in liver increased > 15-fold in old WT mice compared with young ones (2 years versus 3 months), whereas this increase was significantly attenuated to ~7-fold in Sirt1-tg animals (Fig. 2e). Moreover, the number of cells with 53BP1 DNA damage foci in the liver was reduced in old Sirt1-tg mice compared with WT mice of the same age (Fig. 2f). Collectively, the analysis of ageing-associated pathologies (glucose intolerance, osteoporosis, decreased wound healing, impaired neuromuscular coordination) and molecular markers of ageing (p16^{Ink4a}, DNA damage) support the concept that Sirt1 possesses antiageing activity in mammals.

Decreased metabolic syndrome-associated liver cancer. After analysing the effect of Sirt1 on health and cancer during ageing, we wanted to further extend the cancer studies to a model relevant for metabolic syndrome, a condition that affects up to one-quarter of the human population after middle age^{19,20}. The array of diseases comprised by metabolic syndrome can be initiated by a high dietary intake and, in the case of liver, results in fatty liver, which can be followed by cirrhosis and finally cancer^{18,30}. To model metabolic syndrome-associated cancer, we treated mice with a single injection of a hepatic-specific carcinogen, diethylnitrosamine (DEN), followed by continued exposure to HFD. To decrease inter-individual variation due to the hybrid genetic background, all the following assays were performed in mice that had been backcrossed for eight generations with C57BL6 mice and therefore were > 99% C57BL6. Furthermore, it is relevant to note that DEN is a poor carcinogen on its own in mice of a C57BL6 genetic background³¹. In fact, most of our WT mice (6 of 11 = 55%) were completely free of liver tumours at 11 months after treatment with DEN under standard diet conditions. Importantly, all WT mice treated with DEN and under HFD for 11 months developed multiple tumours (on an average 10 tumours) that were quantified and measured in live mice by microcomputed tomography (microCT) (Fig. 3a). Notably, the corresponding Sirt1-tg littermate mice presented a significantly lower incidence and burden of liver tumours (Fig. 3a). On necropsy, the differences in tumour number and size between WT and Sirt1-tg livers were dramatic (Fig. 3b) and histological analyses confirmed that all tumours, both in WT and tg mice, correspond to liver carcinomas (Fig. 3c). We questioned whether the strong protection observed against DEN/HFD-induced hepatocarcinogenesis was also present in other protocols of chemical carcinogenesis. However, when we induced fibrosarcomas with 3-methyl-cholanthrene (3MC), no differences were observed between WT and Sirt1-tg mice (Fig. 3d). This differential cancer protection between hepatocytes and fibroblasts correlates with the effect of Sirt1 on DNA damage in the same cell types (see below). We conclude that moderate upregulation of Sirt1 strongly suppresses metabolic syndrome-associated liver cancer.

Hepatic protection from carcinogenic damage. Sirt1-tg mice present a lower accumulation of ageing-associated DNA damage in the liver (see above Fig. 2f), and other investigators have found that Sirt1 contributes to maintain genomic stability^{5,6}. On the basis of these observations, it can be hypothesized that Sirt1-mediated protection against DEN/HFD-induced liver cancer reflects a dual impact of Sirt1, decreasing the damage produced first by DEN and then by HFD. Although the protection of Sirt1 from HFD-induced damage is well substantiated^{15–17} (see also Supplementary Fig. S3), nothing is known about the impact of Sirt1 on DEN-induced liver damage. Treatment of mice with DEN under standard feeding conditions triggers a well-known cascade of events in the liver that include DNA damage and apoptosis of centrilobular hepatocytes, production of proinflammatory cytokines and compensatory proliferation³². Serum levels of alanine transaminase 48h after DEN injection already indicated a significant protection from liver injury in Sirt1-tg

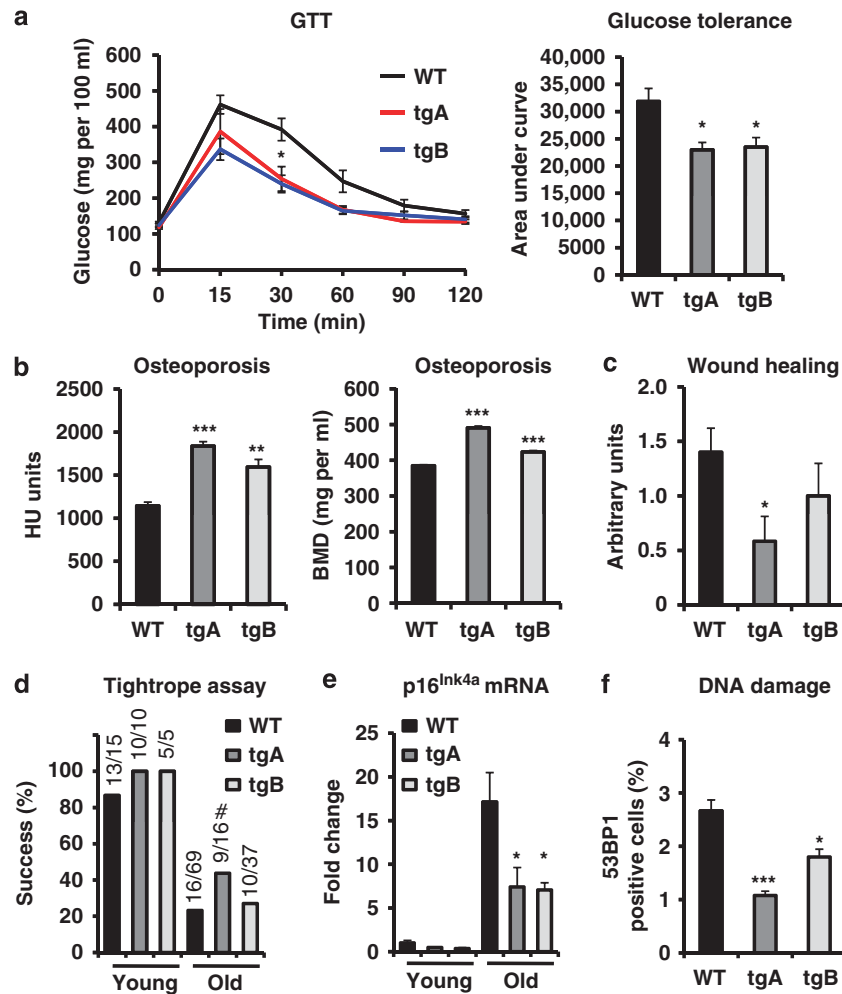


Figure 2 | Improved healthy ageing in Sirt1-tg mice. (a) Glucose tolerance test (GTT) in 1.5-year-old male mice ($n \geq 4$ per group). Curves are shown to the left. Integrated AUCs (area under curve) are shown to the right. (b) Osteoporosis was analysed in 2.5-year-old male mice ($n = 3$ per group) by microCT. Values of Hounsfield units (HU) and bone mineral density (BMD) for all the femurs are shown. (c) Wound-healing assay in ≥ 2 -year-old mice ($n \geq 10$ per group). (d) Neuromuscular coordination assay. Young (< 6 months) and old (> 2 years) mice were subjected to the tightrope assay. (e) Levels of p16^{Ink4a} mRNA in livers of young (< 6 months) and old (≥ 2 years) mice ($n \geq 3$ per group) were analysed by quantitative real-time PCR. Data are relative to the levels in young WT mice. (f) Levels of DNA damage in the liver of old (≥ 2 years) mice ($n \geq 3$ per genotype) measured as the percentage of 53BP1-foci-positive nuclei by confocal microscopy. In all graphs except panel (d), values are given as average \pm s.e.m., and statistical analyses are relative to WT controls and determined by the two-tailed Student's *t*-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$. For panel (d), statistical significance was calculated using Fisher's exact test: # $P < 0.1$.

mice in standard diet (Fig. 4a). Immunohistological examination of livers 48 h after DEN showed intense nuclear staining of Sirt1 restricted to the centrilobular regions of the liver (around the central veins) and absent in the periportal regions (around the portal triad) (Fig. 4b and panoramic views in Supplementary Fig. S5a). Treatment of *in vitro*-cultured cells with genotoxic agents recruits Sirt1 to the chromatin⁶, and we questioned whether this also happens *in vivo* on treating with DEN. Indeed, we observed that DEN increased the amount of chromatin-bound Sirt1 in liver extracts, without detectably affecting the total amount of Sirt1 (Fig. 4c). After observing that Sirt1 actively responds to DEN by concentrating in the nucleus and stably binding to chromatin, we examined the impact of Sirt1-tg on the liver on treatment with DEN under standard feeding conditions. Livers from WT mice showed a strong DNA damage response in centrilobular regions, accompanied by high levels of apoptosis and compensatory proliferation (Fig. 4d and panoramic views in Supplementary Fig. S5b). Importantly, and in sharp contrast, DEN-treated Sirt1-tg livers showed significantly lower levels of damage, apoptosis and compensatory proliferation (Fig. 4d and panoramic views in Supplementary Fig. S5b). DEN is

known to require bioactivation by cytochrome CYP2E1³³, and we asked whether Sirt1 could be exerting its protective effect by directly affecting DEN metabolism. To address this question, we measured CYP2E1 mRNA levels in control or DEN-treated livers. DEN treatment decreased CYP2E1 levels as previously reported³⁴, but no differences in its levels could be observed between WT and Sirt1-tg mice, thus suggesting that Sirt1 does not affect DEN bioactivation (Fig. 4e). Next, we wondered whether Sirt1 protection against DNA damage was also detectable in fibroblasts; however, detailed kinetic analyses of γ H2AX in individual cells upon treatment with neocarzinostatin could not detect a better repair in Sirt1-tg compared with WT fibroblasts (Supplementary Fig. S6). Our assays suggest a cell-type specificity in the effects of Sirt1 on DNA damage, being more protective in hepatocytes than in fibroblasts, and this correlates with a strong protection against DEN/HFD-induced liver carcinoma but not against 3MC-induced fibrosarcomas (see above, and Fig. 3).

Discussion

In this study, we provide direct genetic evidence for the anti-ageing activity of Sirt1 in mammals. We have found that moderate

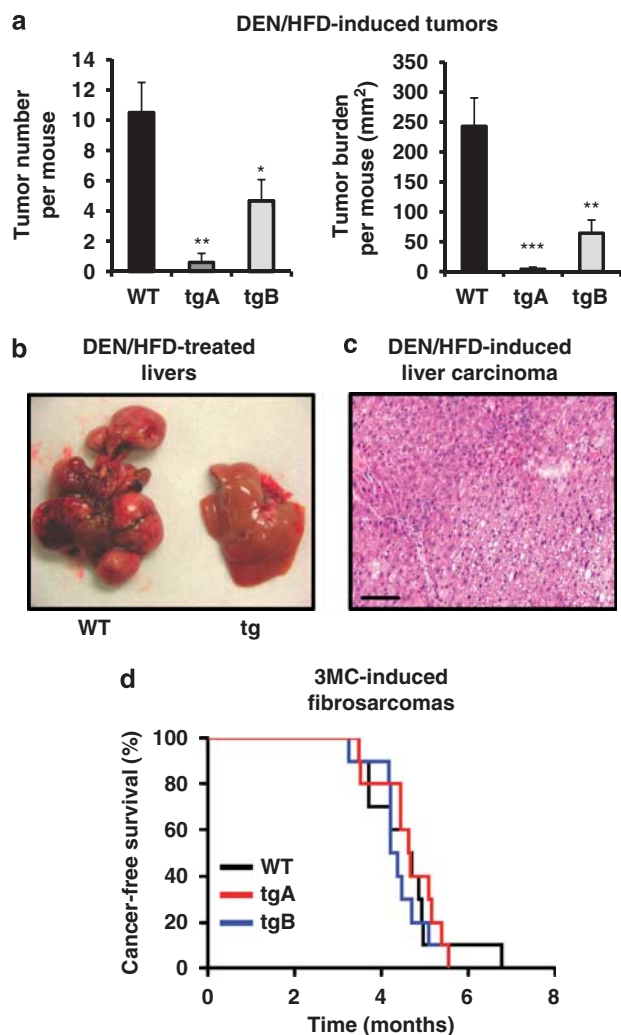


Figure 3 | Sirt1 protects from metabolic syndrome-associated liver cancer. (a) Tumour number and tumour burden in mice injected with DEN and maintained for 11 months under HFD. Tumours were measured by microCT. Tumour burden per mouse was obtained by adding the areas of the biggest transversal section of each tumour. All assays were performed with male mice ($n \geq 5$ per group). Values are given as average \pm s.e.m.; statistical analyses are relative to WT controls and determined by the two-tailed Student's *t*-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$. (b) Macroscopic view of representative livers from littermate mice of the indicated genotypes 11 months after initiation of the DEN/HFD protocol. (c) Histology of a representative liver carcinoma induced by the DEN/HFD protocol. Haematoxylin and eosin staining. The bar indicates 100 μ m. (d) Susceptibility to 3MC-induced fibrosarcomas. Mice of the indicated genotypes were injected intramuscularly with 3MC in one of the rear legs and the latency for the development of fibrosarcomas was scored. The log-rank test indicated no significant differences ($P > 0.6$) between genotypes.

upregulation of Sirt1 expression (threefold) improves healthy ageing but not longevity. Importantly, old Sirt1-tg mice are partially protected from the development of pathologies typically associated with ageing, such as glucose intolerance, osteoporosis and poor wound healing. This improved maintenance of physiological fitness at old ages is accompanied by a decreased expression of molecular markers of ageing in liver, particularly p16^{Ink4a} mRNA levels and nuclear foci of DNA damage. Given the beneficial impact of Sirt1 on ageing, it is tempting to speculate that attaining levels of Sirt1 activity higher than those achieved by us, either genetically

or through the use of pharmacological activators, could lead to an extension of the lifespan. Moreover, considering that there are seven different sirtuins in mammalian organisms, it is also possible that several sirtuins must be targeted concurrently to produce lifespan extension.

An important observation derived from the analyses of old moribund Sirt1-tg mice is that they are partially protected against spontaneous carcinomas and sarcomas, but not from lymphomas. Other investigators have reported that Sirt1 protects against lymphomas in p53-heterozygous mice^{5,6}. It is conceivable that Sirt1 may have a detectable protective effect only in lymphomas with a high degree of genomic instability, such as those in p53-heterozygous mice, but not in the spontaneous lymphomas that develop late in life. In the case of spontaneous carcinomas, it is possible that Sirt1 could exert its protective effect through deacetylation and inhibition of β -catenin⁷, which is an oncogene generally associated with epithelial cancers³⁵. Together, these factors could explain, at least in part, the differential effect of Sirt1 on ageing-associated carcinomas and sarcomas, versus lymphomas. Finally, it should be noted that lymphomas are the most prevalent malignancy in our mouse colonies and, therefore, the lack of effect of Sirt1 on lymphomas could obscure a putative effect of Sirt1 on longevity.

Caloric restriction (CR) is a well-known manipulation with the ability to delay ageing and increase lifespan³⁶. It has been proposed that the beneficial effects of CR in mice are mediated, at least in part, through Sirt1^{37–39}. In this regard, it is interesting to note that our Sirt1-tg mice present an improved glucose tolerance at old age, which is a characteristic feature of CR-treated mice⁴⁰. Further studies are necessary to address the similarities between Sirt1-tg mice under *ad libitum* conditions and CR-treated mice. In this context, it is also worth to point out the similarities between the phenotypes of our Sirt-tg mice and the reported effects of the small natural compound resveratrol on mice, which upregulates Sirt1 activity, perhaps indirectly through effects mediated by AMPK^{13,14}. Mice chronically fed with resveratrol are protected from metabolic syndrome induced by HFD^{13,41} and present improved healthy ageing without affecting longevity⁴². Interestingly, although resveratrol did not protect from spontaneous cancers⁴², our Sirt1-tg mice were partially protected from these cancers.

The role of Sirt1 in protection against metabolic syndrome is solidly established^{15–17}. On this basis, we have developed a novel carcinogenic protocol to model metabolic syndrome-associated cancer. Metabolic syndrome leads over time to liver steatosis, followed by cirrhosis, which, in turn, is the main risk factor for the development of liver carcinoma^{18,30}. Specifically, this new experimental cancer model consists of a single injection of the hepatic-specific carcinogen DEN, followed by continued exposure to HFD. This protocol produced a 100% incidence of liver carcinomas in WT C57BL/6 mice. Importantly, Sirt1-tg littermate mice were dramatically protected. We show here that the resistance to liver cancer in Sirt1-tg mice is due to a dual protective effect both from the initial acute damage elicited by the carcinogen (DEN) and from the chronic damage produced by HFD. In agreement with previous reports implicating Sirt1 in the maintenance of genomic stability^{5,6}, we demonstrate here that Sirt1-tg mice are protected from DEN-triggered DNA damage in hepatocytes *in vivo*. These results reinforce the association between metabolic syndrome and liver cancer, and demonstrate the critical role of Sirt1 in protection from these pathologies. In this context, it is of relevance to mention that recent analyses of Sirt1 expression in various human cancers have found decreased Sirt1 expression in liver cancer, but not in most other human malignancies⁵. Together, our observations demonstrate that chronic and systemic upregulation of Sirt1 is beneficial for health and cancer.

Note added in proof: A similar liver cancer mouse model initiated by DEN and promoted by HFD has been reported while this work was under consideration (Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.-Y.,

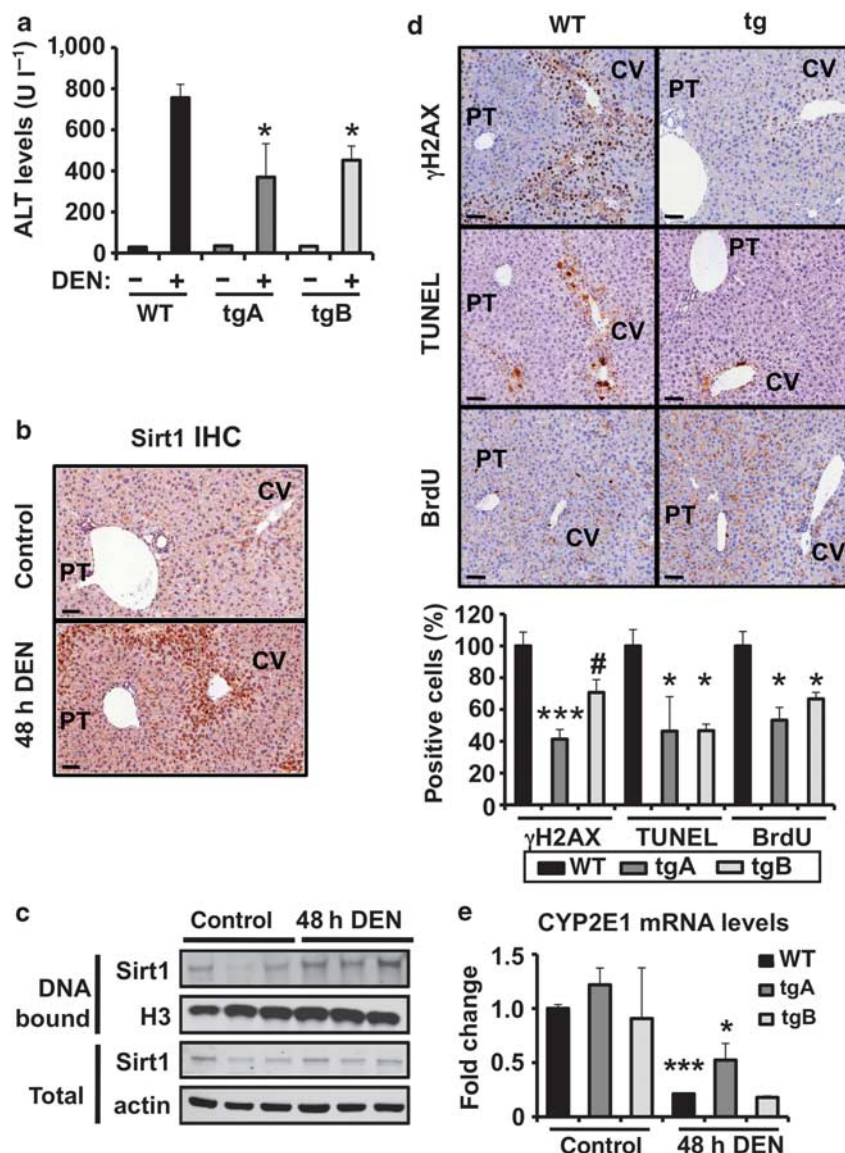


Figure 4 | Sirt1 protects against DNA damage in the liver. (a) ALT levels in serum before or 48 h after DEN injection ($n \geq 3$ per group). (b) Liver sections stained for Sirt1 before or 48 h after DEN injection in WT mice. The bar indicates 50 μ m. (c) Liver protein levels of Sirt1 bound to chromatin or in total extracts from WT mice ($n = 3$) before or 48 h after DEN injection. Histone H3 and actin were used as loading controls. (d) Representative stainings of DNA damage (γ H2AX), apoptosis (TUNEL) and compensatory proliferation (BrdU), each showing a centrilobular area (around a centrilobular vein marked as CV) and a portal area (around a portal triad marked as PT) of livers of mice 48 h after DEN injection. Bars indicate 50 μ m. Quantifications are shown below relative to WT DEN-treated livers. For quantifications, at least five microscope fields at $\times 20$ magnification, always containing a CV and a PT were scored ($n \geq 3$ per genotype). (e) Levels of CYP2E1 in the livers of control or DEN-treated mice ($n \geq 3$ per group). Differences between tg samples and WT control were not significant ($P \geq 0.1$) in all cases. In all graphs, values are given as average \pm s.e.m., statistical analyses are relative to WT controls and determined by the two-tailed Student's *t*-test: # $P < 0.1$; * $P < 0.05$; *** $P < 0.005$.

He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H. & Karin, M. *Cell* **140**, 197–208 (2010).

Methods

Animal experimentation. The Sirt1-tgB line was generated following the same protocol as described for the generation of the Sirt1-tgA line¹⁵. Both bacterial artificial chromosomes (BAC) were obtained from CHORI (identification numbers: RP23-119G23 for tgA line and RP24-306L15 for tgB line) and purified using the Large-Construct kit (Quiagen). For transgenesis, Sirt1-containing bacterial artificial chromosomes were digested with the restriction enzyme *Pi-SceI*, thus linearizing them in the vector at a position adjacent to the T7 end of the genomic inserts. Pronuclei of fertilized oocytes, derived from intercrosses between (C57BL6 \times CBA)F1 mice, were injected with ~ 2 μ l of a DNA solution (~ 1 ng ml⁻¹) containing linearized bacterial artificial chromosomes. The resulting offspring was analysed for the

presence of transgenes using PCR reactions that amplify sequences from each BAC vector (primers tgA-F 5'-AGATAGTTCACCGGGGTGAGAA-3'; tgA-R 5'-TTGCGTTCGAAGAGTATCTGGTG-3'; tgB-F 5'-ACTCTTTAACCGGCCCTTACAAG-3'; tgB-R 5'-TCCTGTGGATCTACCACTAGTCA-3').

All mice were housed at the serum pathogen-free barrier area of the Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid. Mice were treated in accordance with Spanish Laws and the Guidelines for Human Endpoints for Animals Used in Biomedical Research. Mice were observed on a daily basis and killed when they showed signs of morbidity or overt tumours. The genetic background of the mice used in the ageing assays was 87.5% C57BL6 and 12.5% CBA (after two backcrosses). For the rest of the experiments, >99% C57BL6 (after eight backcrosses) mice were used. Mice were fed either with a standard chow diet (Teklad 2018) or with HFD (Research Diets 12451, 45% kJ from fat) when indicated.

For the glucose tolerance test, WT and tg mice on both diets were subjected to 6 h of fasting and injected intraperitoneally (i.p.) with 2 g kg⁻¹ glucose, and glucose

levels in serum were determined using Glucocard strips (A. Menarini Diagnostics). For the wound-healing assay, wounds were made in the back skin using 4 mm biopsy punches, and healing was measured after 48 h by two researchers blind to the experiment, with the following semiquantitative scoring: 0 for well healed, dry and almost closed wounds; 2 for moist and overtly opened wounds; and 1 for intermediate ones. Osteoporosis was assessed in femurs of live mice on a microCT system (eXplore Vista PET/CT; GE Healthcare), analysing the values obtained from scans acquired with 150 mA, 45 kV, 360 projections, 8 shots and 200 μ m of resolution. Bone mineral density and Hounsfield unit measurements were obtained using Microwave Software ABA (Advanced Bone Analysis), selecting an area of interest from the femur. For the neuromuscular coordination assay (tightrope), mice were placed on a bar of circular section (60 cm long and 1.5 cm diameter) and the test was considered successful when a mouse stayed on the bar for a cumulative time of at least 60 s throughout five consecutive trials. For the short time response to DEN, 100 mg kg⁻¹ DEN (Sigma) was injected i.p. to <4-month-old males. To determine proliferation, 100 mg kg⁻¹ BrdU (5-bromodeoxyuridine, Sigma) was injected i.p. 2 h before sacrificing the mice. Alanine transaminase levels in serum were determined using VetScan Comprehensive Diagnostic Profile rotors (Abaxis).

Mouse tumour models. For the DEN/HFD-tumorigenesis model, 16-day-old male mice were injected with 5 mg kg⁻¹ DEN, and then fed on a HFD (see above) since weaning. Tumour detection and measurement were performed by microCT in living mice as described for the osteoporosis measurements, except that, in this case, mice were intravenously injected with the iodinated contrast agent Iopamiro 300 (Bracco). Tumour sizes were measured by their largest transversal areas using eXplore Vista software.

For the 3MC-tumorigenesis model, 2- to 4-month-old animals were injected intramuscularly in one of the rear legs with 1 mg of 3MC (Sigma) dissolved in 100 μ l of corn oil. Mice were observed on a daily basis and killed when the tumours reached a diameter >1.5 cm.

Quantitative RT-PCR. Total RNA from all tissues was extracted with Trizol (Invitrogen). Reverse transcription was performed using random priming and Superscript Reverse Transcriptase (Life Technologies). Quantitative real-time PCR was performed using DNA Master SYBR Green I mix (Applied Biosystems) in an ABI PRISM 7700 thermocycler (Applied Biosystems). Variations in input RNA were corrected by subtracting the number of PCR cycles obtained for β -actin. Primer sequences are described in Supplementary Table S1.

Protein analyses. For isolation of hepatocytes, livers were collected and sliced into small pieces with surgical blades and then incubated at 37 °C for 30 min with 2 mg ml⁻¹ of collagenase (Stem Cell Technologies) solution containing 10 mM HEPES, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5% glucose, 0.7 mM CaCl₂, 1 mM of dithiothreitol and a cocktail of protease inhibitors. Hepatocytes were then filtered through a 70 μ m cell strainer (BD). To isolate chromatin, hepatocytes were resuspended in 200 μ l of buffer containing 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M sucrose and 10% glycerol. Thereafter, Triton X-100 was added to a final concentration of 0.1%. Intact nuclei were spun down and resuspended in a buffer containing 3 mM EDTA and 0.2 mM EGTA, followed by incubation on ice for 30 min. The pellet obtained after spinning down these samples contained the isolated chromatin, which was resuspended in 1 \times Laemmli buffer. The following antibodies were used: anti-Sirt1 (ab12193, Abcam, 1:2,000), anti-actin (AC-15, Sigma, 1:5,000) and anti-H3 (ab1791, Abcam, 1:1,000), anti-Ac(K310)-p65 (ab19870, Abcam, 1:200) and anti-p65 (sc-8008, Santa Cruz, 1:200).

Histological and immunohistochemical methods. A detailed histopathological analysis of aged moribund mice was performed by one of the authors (Cañamero, a trained pathologist). Liver sections from DEN-treated mice were stained with the following antibodies: anti-Sirt1 (S5196, Sigma, 1:3,000), anti-BrdU (BU-1, GE Healthcare, 1:100) or anti- γ H2AX (JBW301, Millipore, 1:2,000). For TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) stainings, an ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit was used (Millipore). DNA damage in aged livers was assessed by confocal immunofluorescence against 53BP1 (NB100-304, Novus Biologicals, 1:500) on paraffin-embedded sections. For quantifications of DNA damage (γ H2AX), apoptosis (TUNEL) and compensatory proliferation (BrdU) in DEN-treated livers, at least five microscope fields at $\times 20$ magnification, and always containing a centrilobular vein and a portal triad, were scored for positive cells ($n \geq 3$ per genotype). In all graphs, the values represented are relative to WT controls.

Statistical analyses. Kaplan–Meier curves were compared using the log-rank test. Cancer incidences were compared using Fisher's exact test. All other measurements were compared using the two-tailed Student's *t*-test.

References

- Bishop, N. A. & Guarente, L. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 835–844 (2007).
- Michan, S. & Sinclair, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* **404**, 1–13 (2007).
- Garber, K. A mid-life crisis for aging theory. *Nat. Biotechnol.* **26**, 371–374 (2008).
- Deng, C. X. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 147–152 (2009).
- Wang, R. H. *et al.* Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* **14**, 312–323 (2008).
- Oberdoerffer, P. *et al.* SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* **135**, 907–918 (2008).
- Firestein, R. *et al.* The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One* **3**, e2020 (2008).
- Howitz, K. T. *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**, 191–196 (2003).
- Milne, J. C. *et al.* Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* **450**, 712–716 (2007).
- Alcain, F. J. & Villalba, J. M. Sirtuin activators. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **19**, 403–414 (2009).
- Beher, D. *et al.* Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chem. Biol. Drug. Des.* **74**, 619–624 (2009).
- Pacholec, M. *et al.* SIRT1720, SIRT2183, SIRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J. Biol. Chem.* **285**, 8340–8351 (2010).
- Baur, J. A. *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**, 337–342 (2006).
- Canto, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056–1060 (2009).
- Pfluger, P. T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M. & Tschop, M. H. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 9793–9798 (2008).
- Banks, A. S. *et al.* Sirt1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell. Metab.* **8**, 333–341 (2008).
- Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 545–558 (2010).
- Watanabe, S., Yaginuma, R., Ikejima, K. & Miyazaki, A. Liver diseases and metabolic syndrome. *J. Gastroenterol.* **43**, 509–518 (2008).
- Huang, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* **2**, 231–237 (2009).
- Luchsinger, J. A. A work in progress: the metabolic syndrome. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2006**, pe19 (2006).
- Yeung, F. *et al.* Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* **23**, 2369–2380 (2004).
- Ladiges, W. *et al.* Lifespan extension in genetically modified mice. *Aging Cell* **8**, 346–352 (2009).
- Guarente, L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* **444**, 868–874 (2006).
- Ruocco, M. G. *et al.* I κ B kinase (IKK) β , but not IKK α , is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J. Exp. Med.* **201**, 1677–1687 (2005).
- Chang, J. *et al.* Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor- κ B. *Nat. Med.* **15**, 682–689 (2009).
- Adler, A. S. *et al.* Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- κ B activity. *Genes. Dev.* **21**, 3244–3257 (2007).
- Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* **114**, 1299–1307 (2004).
- Sedelnikova, O. A. *et al.* Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat. Cell. Biol.* **6**, 168–170 (2004).
- Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D. & Sedivy, J. M. Cellular senescence in aging primates. *Science* **311**, 1257 (2006).
- Powell, E. E., Jonsson, J. R. & Clouston, A. D. Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology* **42**, 5–13 (2005).
- Sun, D. *et al.* Inactivation of p27Kip1 promotes chemical mouse liver tumorigenesis in the resistant strain C57BL/6J. *Mol. Carcinog.* **47**, 47–55 (2008).
- Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H. & Karin, M. IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* **121**, 977–990 (2005).
- Kang, J. S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Gonzalez, F. J. & Fukushima, S. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis *in vivo*. *Cancer Res.* **67**, 11141–11146 (2007).
- Freeman, J. E., Stirling, D., Russell, A. L. & Wolf, C. R. cDNA sequence, deduced amino acid sequence, predicted gene structure and chemical regulation of mouse Cyp2e1. *Biochem. J.* **281**(Part 3), 689–695 (1992).
- Polakis, P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 45–51 (2007).
- Guarente, L. & Picard, F. Calorie restriction—the SIR2 connection. *Cell* **120**, 473–482 (2005).
- Chen, D., Steele, A. D., Lindquist, S. & Guarente, L. Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science* **310**, 1641 (2005).
- Bordone, L. *et al.* SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* **6**, 759–767 (2007).
- Boily, G. *et al.* Sirt1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS One* **3**, e1759 (2008).

40. Hempenstall, S., Picchio, L., Mitchell, S. E., Speakman, J. R. & Selman, C. The impact of acute caloric restriction on the metabolic phenotype in male C57BL/6 and DBA/2 mice. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 111–118 (2010).
41. Lagouge, M. *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* **127**, 1109–1122 (2006).
42. Pearson, K. J. *et al.* Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell. Metab.* **8**, 157–168 (2008).

Acknowledgments

We are indebted to Gema Iglesias for excellent mouse handling. We thank Antonio Maraver and Pablo J. Fernández-Marcos for helpful discussions. D.H. is supported by a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Health and by the 'Francisco Cobos' Foundation. Work in the laboratory of M.S. is funded by the CNIO and by grants from the Spanish Ministry of Science (SAF and CONSOLIDER), the Regional Government of Madrid (GsSTEM), the European Union (PROTEOMAGE), the European Research Council (ERC Advanced Grant) and by the 'Marcelino Botín' Foundation. The sponsors had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the paper.

Author contributions

D.H. performed most of the experiments, contributed to data analysis, discussion and writing the paper; M.M.M. performed all the mouse manipulations; M.C. performed all pathological analyses; F.M. performed all the imaging analyses by microCT; B.M.-P. performed the DNA repair assays; O.F.C. designed and supervised the DNA damage data; M.S. designed and supervised the study, secured funding, analysed the data and wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the paper.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper on <http://www.nature.com/naturecommunications>.

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

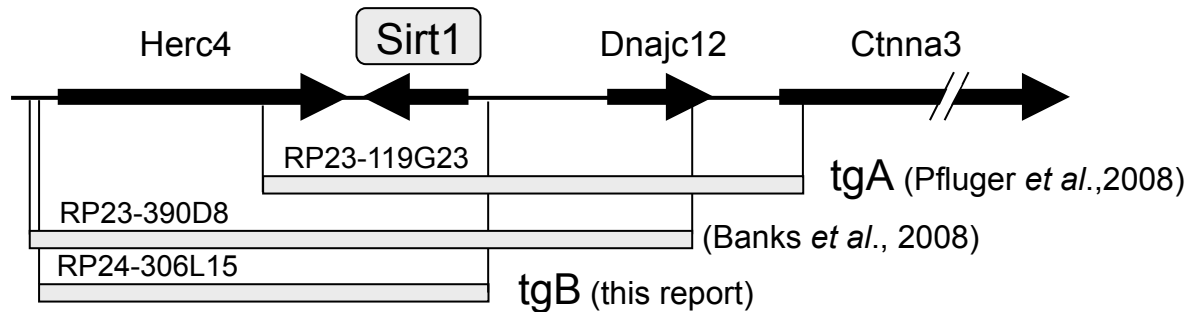
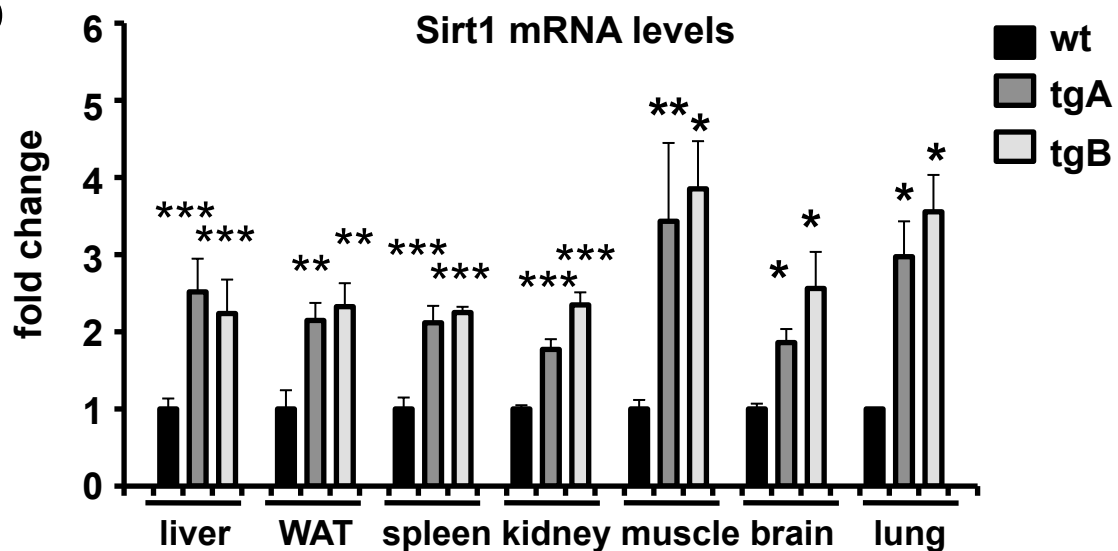
Reprints and permission. Reprints and permission information is available at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Herranz, D. *et al.* Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat. Commun.* x:x doi: 10.1038/1001 (2010).

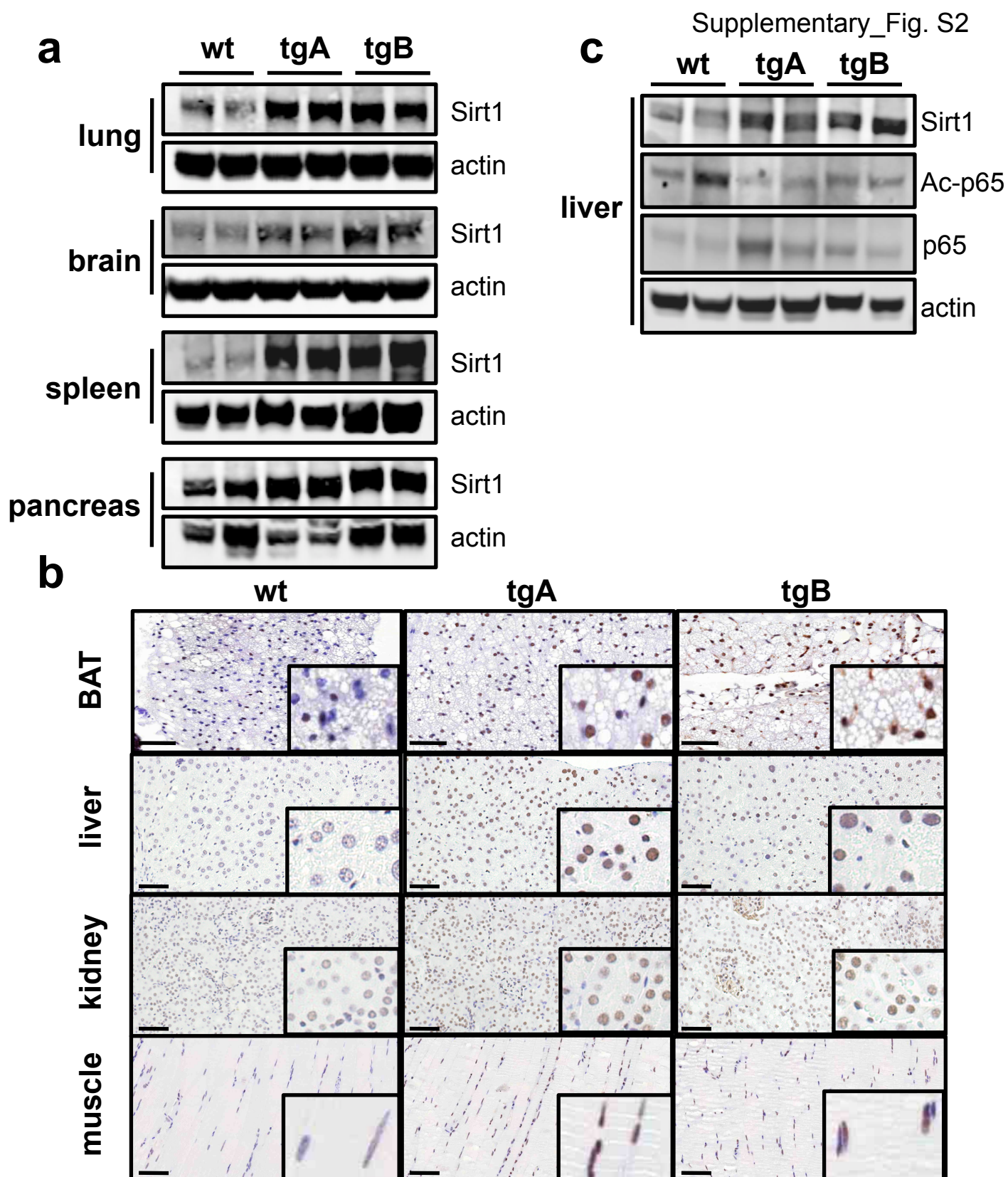
SUPPLEMENTARY TABLE

Supplementary Table S1. Primer sequences used in qRT-PCR measurements.

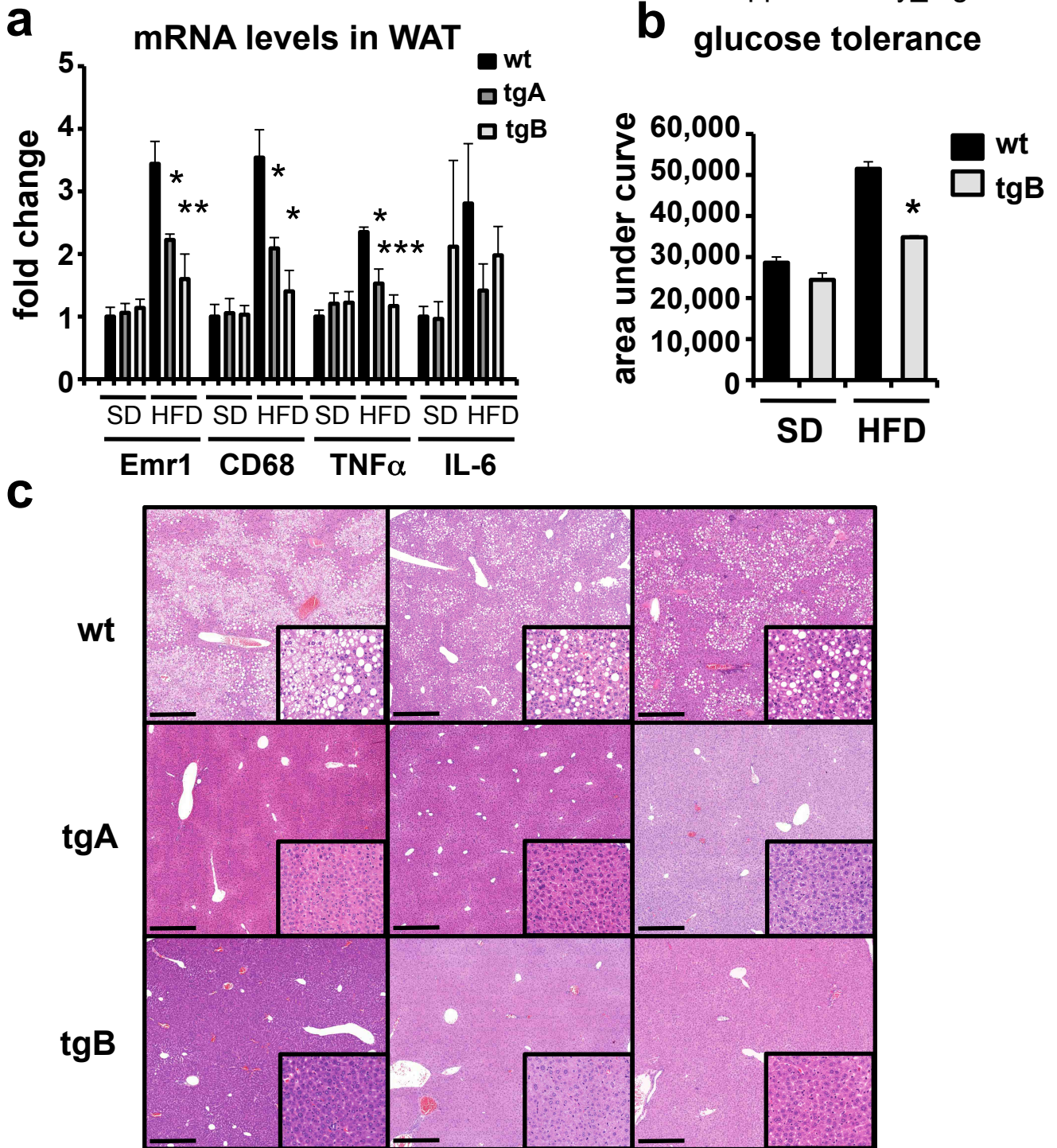
Sirt1-F	5'-GACGATGACAGAACGTCACAC-3'
Sirt1-R	5'-CGAGGATCGGTGCCAATCA-3'
Actin-F	5'-GGCACCACACCTTCTACAATG-3'
Actin-R	5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'
p16 ^{Ink4a} -F	5'-CGTACCCCGATTCAGGTGAT-3'
p16 ^{Ink4a} -R	5'-TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT-3'
TNF α -F	5'-CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'
TNF α -R	5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
IL6-F	5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'
IL6-R	5'-TCCACGATTTCCCAGAGAAC-3'
Emr1-F	5'-TGA CTCACCTTGTGGTCCTAA-3'
Emr1-R	5'-CTTCCCAGAATCCAGTCTTTCC-3'
CD68-F	5'-TGTCTGATCTTGCTAGGACCG-3'
CD68-R	5'-GAGAGTAACGGCCTTTTTGTGA-3'
CYP2E1-F	5'-CGTTGCCTTGCTTGTCTGGA-3'
CYP2E1-R	5'-AAGAAAGGAATTGGGAAAGGTCC-3'

a**b**

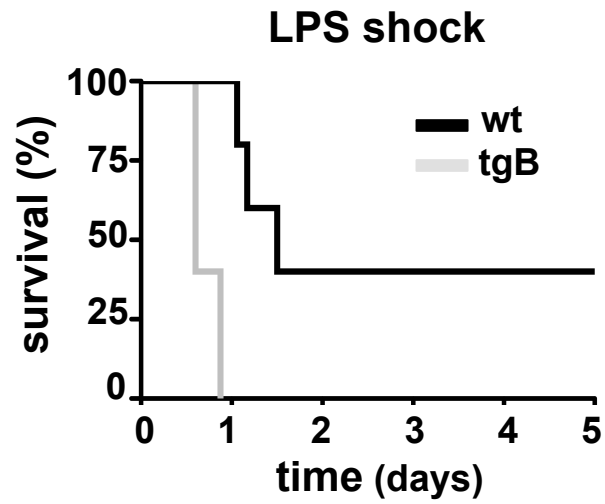
Supplementary Figure S1. Sirt1 mRNA expression levels in wt and Sirt1-tg mice. (a) Scheme of the BACs used for the generation of strains tgA and tgB, as well as, the BAC used in a similar study (see references in the main text). (b) Sirt1 mRNA levels in tissues from wt and Sirt1-tg measured by qRT-PCR. Data are mean values \pm S.E.M. ($n \geq 3$ per genotype and tissue). Statistical analyses were done using Student's t-test vs control mice: * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$.



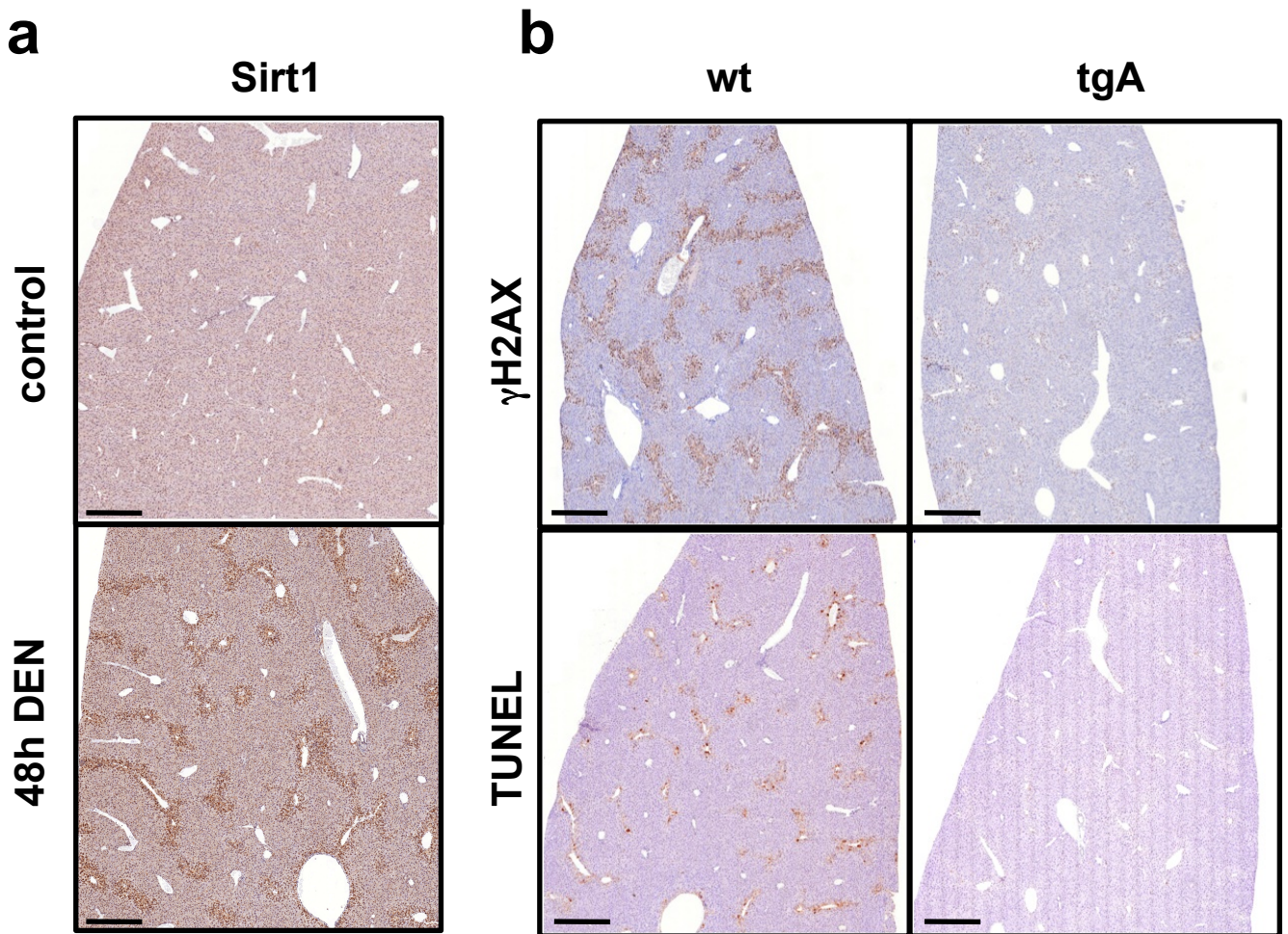
Supplementary Figure S2. Sirt1 protein expression and activity levels in wt and Sirt-tg mice. (a) Sirt1 protein levels in tissues from wt and Sirt1-tg mice measured by immunoblot. (b) Sirt1 expression levels in paraffin-embedded tissue sections by immunohistochemistry. Bars for BAT correspond to 50 μ m. Bars for the rest of tissues correspond to 100 μ m. (c) Sirt1 activity in liver extracts measured the levels of AcK310-p65 by immunoblot.



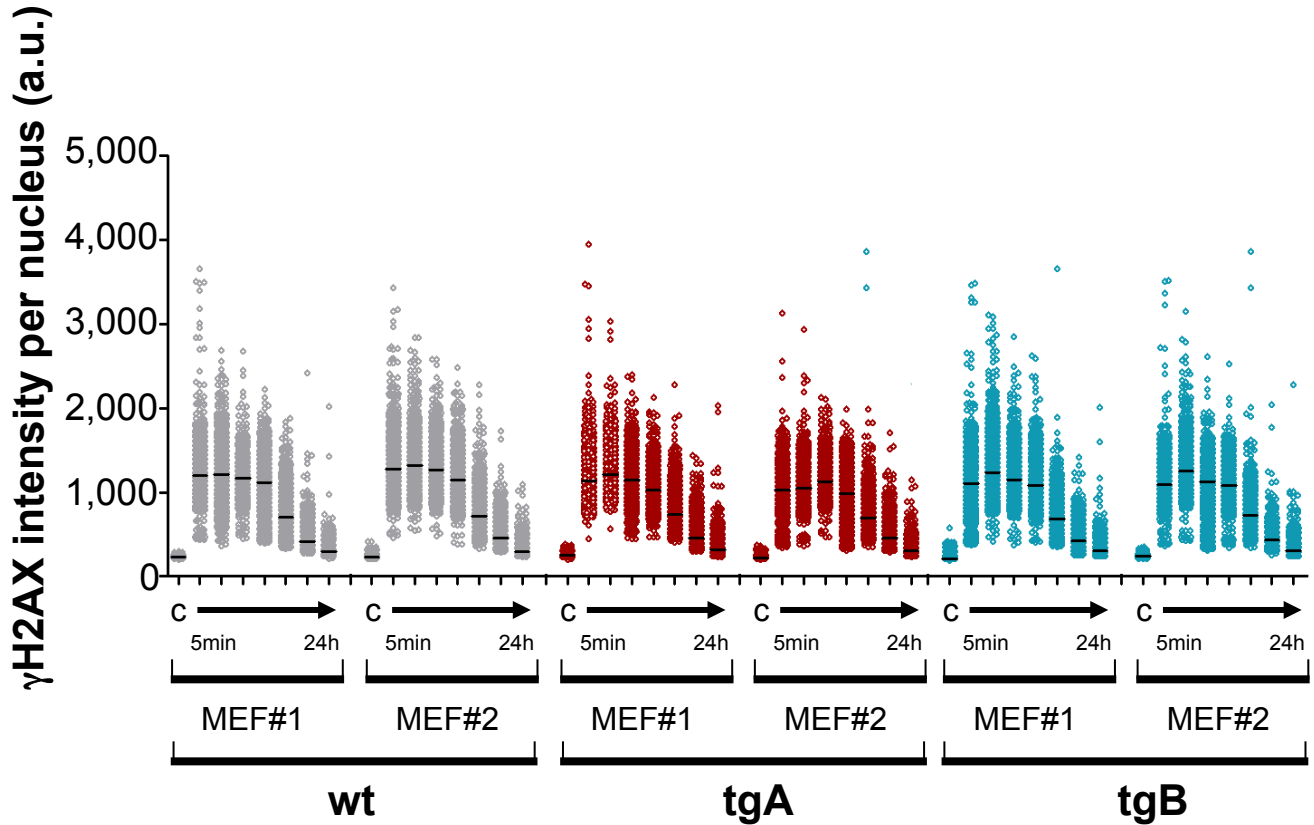
Supplementary Figure S3. Sirt1-tgB mice are protected from metabolic syndrome. (a) Macrophage infiltration (Emr1 and CD68) and inflammation (TNFα and IL-6) in white adipose tissue measured by qRT-PCR ($n \geq 3$ per group) in mice maintained either on SD or HFD for 4 months. (b) Glucose tolerance test (GTT) in wt and Sirt1-tgB mice ($n = 5$ per group), either on standard diet (SD) or high-fat diet (HFD), represented as the Area Under Curve (AUC). (c) Liver H/E sections from wt or Sirt1-tg mice fed with HFD for 4 months. Sections from three independent mice per genotype are shown. Bars correspond to 500 μ m. Data in graphs correspond to mean values \pm S.E.M. Statistical analyses were done using the two-tailed Student's t-test vs wt HFD mice: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.



Supplementary Figure S4. Sirt1-tgB mice are hypersensitive to septic shock. Mice under standard diet were injected i.p. with 20 mg/kg of *Escherichia coli*-derived LPS serotype 0111:B4 (Sigma) and then monitored every 8 h for a 72 h period. Logrank test was used to determine statistical significance.



Supplementary Figure S5. Liver protection from DEN by Sirt1. (a) Low magnification view of wt liver immunohistochemical sections stained for Sirt1 before or 48 h after DEN injection. (b) Low magnification view of liver sections of the indicated genotype 48 hours after DEN injection stained to detect DNA damage (γH2AX) or apoptosis (TUNEL). Bars correspond to 500 μm.



Supplementary Figure S6. Normal DNA damage repair in Sirt1-tg fibroblasts. The figure represents the kinetics of H2AX phosphorylation in wt, tgA and tgB primary MEFs (two independent preparation of each genotype) upon exposure to the radiomimetic drug neocarzinostatin for 1 hr (100 ng/ml) and then washed and released in drug-free media. Each of the dots represents the γ H2AX signal per individual nucleus. Images were acquired at various times post-treatment (5 min, 30 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 8 hr and 24 hr) using a high-throughput microscopy platform. For this, cells were grown on μ CLEAR bottom 96-well dishes (Greiner Bio-One) and analyzed with a bioimager (BD Pathway 855; Beckton Dickinson). Image acquisition was performed at room temperature using oil as an immersion media and a camera (ORCA 1394; Hamamatsu Photonics) with a 40 \times objective (HCX PL APO, 0.75 NA). Image analysis was performed with Imaging software (AttoVision; BD Biosciences). All the images for quantitative analyses were acquired under nonsaturating exposure conditions.

BRIEF COMMUNICATIONS

Policing of oncogene activity by p53

Oncogenes, rather than DNA damage, may provide the key signal to p53 to trigger tumour suppression.

The tumour-suppressor protein p53 provides the most important genetic defence against cancer¹ and is activated in response to DNA damage and to oncogenic signalling, both of which occur almost universally in malignant tumours. But the relative contribution of these two pathways in inducing p53-dependent protection against cancer is unclear. Here we show that p53-dependent protection against cancer is lost in mice that have been genetically manipulated so that their p53 is activated in response to DNA damage but not to oncogenic signalling. We conclude that oncogenic signalling is the critical event that elicits p53-dependent protection and that the DNA-damage stimulus is less important.

DNA damage and oncogenic signalling are communicated to p53 through separate routes, which are, respectively, a p53-phosphorylation cascade that involves the ATM/Chk2/ATR/Chk1 series of kinases, and a p53-stabilization pathway that requires the tumour-suppressor protein ARF and the ubiquitin-ligase MDM2 (ref. 1).

To investigate the role of oncogenic signalling in p53-mediated protection against cancer, we used mice with two genetically engineered traits: one had no *ARF* allele (*ARF*^{null} mice)² and the other had a 'super' *p53* allele³ (*p53*^{super} mice; these mice carry a single additional transgenic copy of the intact *p53* gene, which behaves in the same way as endogenous *p53*). Compared with wild-type mice (*p53*^{wt} mice), which have just two copies of *p53*, the *p53*^{super} mice have additional protection against cancer development². This experimental system is therefore well suited for quantifying p53-dependent protection against cancer. (See supplementary information for methods.)

Before analysing their susceptibility to cancer, we confirmed that *ARF*^{null} mice respond normally to DNA damage^{4,5} by showing that apoptosis of their thymocytes after irradiation was unaffected (Fig. 1a). We found that mice with the *p53*^{super} allele showed the same enhancement of apoptosis irrespective of

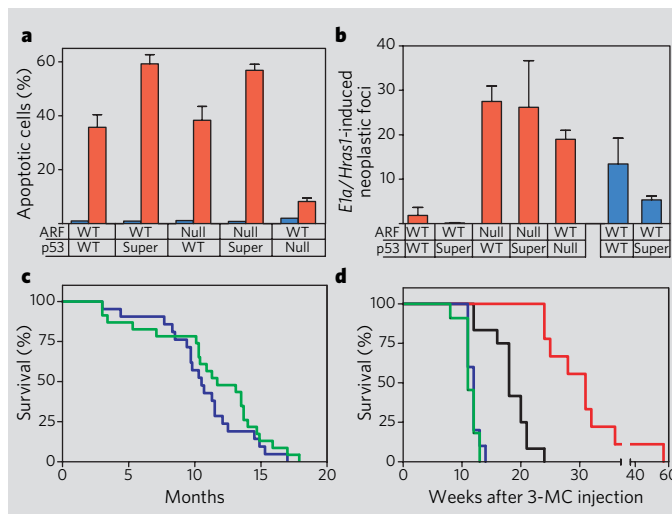


Figure 1 | ARF is necessary for tumour suppression by p53. **a**, The p53-dependent DNA-damage response *in vivo* does not depend on ARF. Mice ($n = 3$ per genotype) were irradiated (10 Gy) and the percentage of apoptotic thymocytes was determined 3 h later. Blue bars, non-irradiated controls; red bars, cells from irradiated mice. **b**, ARF is essential for the defensive response to oncogenic signals. Primary embryonic fibroblasts (from $n = 2$ embryos per genotype) were retrovirally transduced with *E1a* and oncogenic *Hras1* and plated as indicated, and the number of resulting neoplastic foci was scored. Red bars, 2,000 cells; blue bars, 50,000 cells. WT, wild type. **c**, Lifespans of *ARF*^{null}/*p53*^{wt} and *ARF*^{null}/*p53*^{super} mice ($n = 21$ (blue) and $n = 23$ (green) per genotype, respectively) were not significantly different (log rank test, $P = 0.26$). **d**, Mice of genotype *ARF*^{wt}/*p53*^{wt} ($n = 12$; black), *ARF*^{wt}/*p53*^{super} ($n = 9$; red), *ARF*^{null}/*p53*^{wt} ($n = 10$; blue) or *ARF*^{null}/*p53*^{super} ($n = 11$; green) were treated with the DNA-damaging agent 3-methyl cholanthrene (3-MC) and monitored for the development of fibrosarcomas. The protection against tumour development provided by the *p53*^{super} allele in the presence of ARF disappears in the absence of ARF; (see also supplementary information).

whether ARF was present or absent (Fig. 1a). However, *ARF*^{null} cells were unable to respond effectively to oncogenic signalling^{6–8} and underwent neoplastic transformation by oncogenes *in vitro*, irrespective of the presence or absence of the *p53*^{super} allele (Fig. 1b).

As p53 responds normally to DNA damage in the absence of ARF, we reasoned that *p53*^{super} might provide some protection against tumour development *in vivo*, even without the ability to detect oncogenic signalling. However, we found that *p53*^{super}/*ARF*^{null} mice succumbed to spontaneous tumours at the same rate as *p53*^{wt}/*ARF*^{null} mice (Fig. 1c), producing the same profile of sarcomas, lymphomas and histiocytic sarcomas (results not shown).

We also treated *p53*^{super}/*ARF*^{null} and *p53*^{wt}/*ARF*^{null} mice with the DNA-damaging agent 3-methyl cholanthrene. This agent produces

DNA adducts and results in fibrosarcomas carrying oncogenic mutations in *ras* genes (see supplementary information). This carcinogenic protocol is highly sensitive to the functionality of p53, as indicated by the greater resistance to the agent of *p53*^{super} mice compared with *p53*^{wt} mice³. As with the spontaneous tumours, the extra gene dose of *p53* became irrelevant in the absence of ARF (Fig. 1d).

Together, our results indicate that the cancer-protective activity of p53 is abolished in the absence of ARF. We conclude that oncogenic signalling is critical for triggering protection by p53, whereas activation of p53 as a result of DNA damage has a lesser impact on the ultimate development of tumours. Although there are differences in these pathways in mice and humans, our findings may also explain the high incidence of ARF loss in human cancers⁹, as well as the low incidence of mutations in the kinase enzymes of the p53-phosphorylation cascade¹⁰ that is induced by DNA damage.

Alejo Efeyan, Isabel Garcia-Cao, Daniel Herranz, Susana Velasco-Miguel, Manuel Serrano
Spanish National Cancer Centre (CNIO), Madrid 28029, Spain

e-mail: mserrano@cnio.es

- Harris, S. L. & Levine, A. J. *Oncogene* **24**, 2899–2908 (2005).
- Kamijo, T. et al. *Cell* **91**, 649–659 (1997).
- Garcia-Cao, I. et al. *EMBO J.* **21**, 6225–6235 (2002).
- Stott, F. J. et al. *EMBO J.* **17**, 5001–5014 (1998).
- Kamijo, T. et al. *Cancer Res.* **59**, 2464–2469 (1999).
- Palmero, I., Pantoja, C. & Serrano, M. *Nature* **395**, 125–126 (1998).
- Zindy, F. et al. *Genes Dev.* **12**, 2424–2433 (1998).
- de Stanchina, E. et al. *Genes Dev.* **12**, 2434–2442 (1998).
- Sharpless, N. E. *Mutat. Res.* **576**, 22–38 (2005).
- Bartek, J. & Lukas, J. *Cancer Cell* **3**, 421–429 (2003).

Supplementary information accompanies this communication on Nature's website.

Received 1 August; accepted 22 August 2006.

Competing financial interests: declared none.
doi:10.1038/443159a

BRIEF COMMUNICATIONS ARISING online
www.nature.com/bca see Nature contents.

Supplementary information

Contents:

Methods
Table S1
Figure S1
Figure S2
References

Methods

Mice and cells. All animals used in this report were in a C57BL6 genetic background. Animals were housed under SPF conditions at the Spanish National Cancer Centre. All mice were monitored twice per week and upon signs of morbidity, or when required, were euthanized in accordance to the “Guidelines for Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research”. MEFs were obtained from 13.5 day embryos and cultivated under standard conditions ^{1, 2}. All the MEFs used were minimally passaged (<3 passages).

Apoptosis. Young mice (3-6 months old) received whole-body irradiation (10 Gy) and, 3 h after, thymocytes were collected and apoptotic cells with sub-G0/G1 DNA content were quantified by flow cytometry using the Coulter DNA Prep Reagent Kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA) in a FACScalibur cytometer and the CellQuest-Pro software (Beckman).

Cell-cycle analysis. MEFs at subconfluent density were treated with the indicated concentration of 3-methyl-cholanthrene (Sigma-Aldrich) and 72 h after, cells were trypsinized and fixed in 70% ethanol. Cells were stained with Propidium Iodide (PI) and S-phase was quantified by using a FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) flow cytometer and the ModFit software (Verity Software House).

Oncogenic assay in MEFs. For E1a/Ras-induced foci, MEFs were infected with pLPC-E1a-IRES-H-RasV12 (or the corresponding empty vector as control) and after selection, 2,000 or 50,000 cells were plated separately. Three weeks later, cells were fixed in formaldehyde, stained with Giemsa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), and neoplastic foci were scored.

Tumours. For chemical carcinogenesis, 3-5 months old mice received 1 mg of 3-methyl-cholanthrene (Sigma-Aldrich) in 50 µl of sesame oil by intramuscular injection in the right leg. Mice were examined twice per week until the tumour was palpable (for a more detailed description see ³) and scored in Kaplan-Meier graphs. For spontaneous tumour development, cohorts of mice were followed until overt signs of morbidity. Moribund mice were sacrificed and full necropsies and histopathological analyses were performed.

Mutations in Ras genes. Genomic DNA was extracted from 3MC-induced fibrosarcomas by standard methods. For RFLP, PCR, restriction enzyme digestion and gel electrophoresis were done as previously described⁴ but replacing the KRas 12 primer R by 5'- CTGTAGAGCAGCGTTACC-TCTATC -3'. For direct sequencing of the Ras genes, the following primers were used: KRas (hotspot 12-13): GAAGATGAAAGTACTGGTTTCCATG and CTGTAGAGCAGCGTTACC-TCTATC; KRas (hotspot 61): GACTCCTACAGGAAACAAGTAGTA and TATGGCAAATACACAAAGAAAGCC; NRas (hotspot 12-13): ATGACTGAG-TACAAACTGGTGG and CAAAGTGAGGATAAGGGCC; NRas (hotspot 61): CCCAGGATTCTTACCGAAAGC and GGCAAATACACAGAGGAACCCT; HRas (hotspot 12-13): CTATTAGCCGTCTCAAGTGGCA and TGGATGGTCA-GGGCACTCTT; HRas (hotspot 61): CCCCCTAAGCCGTGTTGTT and AGGAA-GCCCTCCCCTGTG. There was complete concordance between the RFLP and sequencing results.

Northern blots. Total RNA was extracted using standard methods. The probe for MDM2 was obtained as described⁵, and the probe for ARF corresponded to exon 1 β and was obtained as described⁶. Quantifications were performed using MEFs as reference control. Those tumours with more than 5x levels of MDM2 were considered positive regarding MDM2 overexpression; those tumours with less than 20% levels of ARF were considered positive regarding ARF silencing.

Table S1

Oncogenic alterations in 3MC-induced fibrosarcomas

Genotype	K-Ras mutations* (%)	N-Ras mutations* (%)	MDM2 overexpression ^s (%)	ARF silencing ^s (%)
ARF ^{wt} /p53 ^{wt}	1/11 (9)	1/11 (9)	0/12 (0)	0/12 (0)
ARF ^{wt} /p53 ^{super}	4/12 (33)	1/12 (8)	5/16 (31)	5/16 (31)
ARF ^{null} /p53 ^{wt}	3/10 (30)	0/10 (0)	1/7 (14)	not applicable
ARF ^{null} /p53 ^{super}	4/10 (40)	0/12 (0)	1/8 (12)	not applicable

* Evaluated both by RFLP and sequencing (see Methods); no mutations were found in H-Ras; in one case, a tumour in a mouse ARF^{wt}/p53^{super}, mutations in K- and N-Ras occurred together.

\$ Evaluated by Northern blot (see Methods).

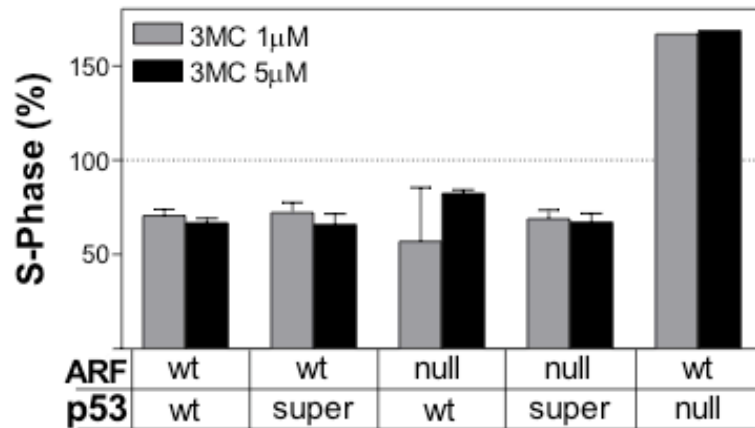


Figure S1. ARF is not involved in the p53-mediated cell cycle arrest induced by 3MC. MEFs (n=2 per genotype) were exposed to 3MC and the percentage of S-phase cells was measured by flow cytometry 72 h later. Data are relative to the percentage of S-phase cells in non-treated cultures.

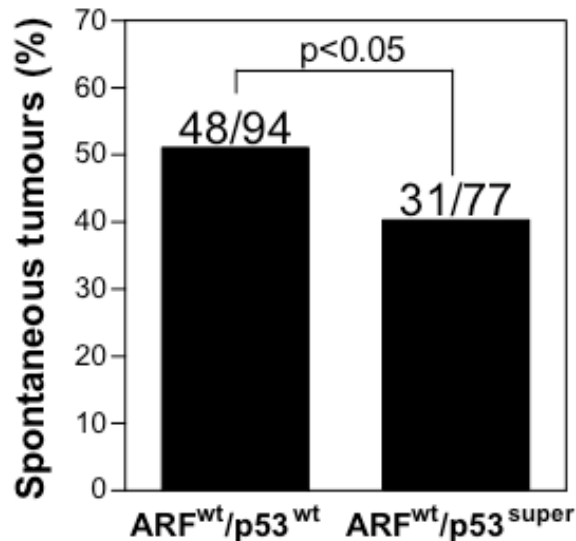


Figure S2. The super-p53 allele decreases the incidence of malignant tumours in ARF-proficient mice. Cohorts of mice were followed through their lifespan until moribund, when necropsy and histopathological analyses were performed. Numbers on top correspond to the total number of malignant tumours found divided by the total number of moribund mice analyzed.

REFERENCES

1. Pantoja, C. & Serrano, M. Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 18, 4974-82 (1999).
2. Palmero, I. & Serrano, M. Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol* 333, 247-56 (2001).
3. Matheu, A., Klatt, P. & Serrano, M. Regulation of the INK4a/ARF locus by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280, 42433-41 (2005).
4. Perez de Castro, I. P., Malumbres, M., Santos, J., Pellicer, A. & Fernandez-Piqueras, J. Cooperative alterations of Rb pathway regulators in mouse primary T cell lymphomas. *Carcinogenesis* 20, 1675-82 (1999).
5. Velasco-Miguel, S. et al. Constitutive and regulated expression of the mouse Dinb (Polkappa) gene encoding DNA polymerase kappa. *DNA Repair (Amst)* 2, 91-106 (2003).
6. Pantoja, C., Palmero, I. & Serrano, M. Identification of the gene immediately downstream of the murine INK4a/ARF locus. *Exp Gerontol* 36, 1289-302 (2001).

Induction of p53-Dependent Senescence by the MDM2 Antagonist Nutlin-3a in Mouse Cells of Fibroblast Origin

Alejo Efeyan,¹ Ana Ortega-Molina,¹ Susana Velasco-Miguel,¹ Daniel Herranz,¹ Lyubomir T. Vassilev,² and Manuel Serrano¹

¹Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain and ²Discovery Oncology, Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, New Jersey

Abstract

Cellular senescence is emerging as an important *in vivo* anti-cancer response elicited by multiple stresses, including currently used chemotherapeutic drugs. Nutlin-3a is a recently discovered small-molecule antagonist of the p53-destabilizing protein murine double minute-2 (MDM2) that induces cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells with functional p53. Here, we report that nutlin-3a induces cellular senescence in murine primary fibroblasts, oncogenically transformed fibroblasts, and fibrosarcoma cell lines. No evidence of drug-induced apoptosis was observed in any case. Nutlin-induced senescence was strictly dependent on the presence of functional p53 as revealed by the fact that cells lacking p53 were completely insensitive to the drug, whereas cells lacking the tumor suppressor alternative reading frame product of the *CDKN2A* locus underwent irreversible cell cycle arrest. Interestingly, irreversibility was achieved in neoplastic cells faster than in their corresponding parental primary cells, suggesting that nutlin-3a and oncogenic signaling cooperate in activating p53. Our current results suggest that senescence could be a major cellular outcome of cancer therapy by antagonists of the p53-MDM2 interaction, such as nutlin-3a. [Cancer Res 2007;67(15):7350–7]

Introduction

The tumor suppressor p53 is among the most important anti-tumoral defenses in mammalian cells. This is reflected by the fact that the large majority of malignant tumors have acquired mutations that impair the functionality of p53. All together, approximately half of all human malignancies harbor mutations in p53 (1). The remaining tumors usually contain alterations in the two main regulators of p53 stability [i.e., amplification of the negative p53 regulator murine double minute-2 (MDM2) or loss of the MDM2 inhibitor alternative reading frame product of the *CDKN2A* locus (ARF); refs. 1–3]. In agreement with the high frequency of aberrations in the ARF/MDM2 regulatory pair, we and others have recently shown that ARF is critical in mice for p53-dependent tumor suppression (4, 5).

The importance of ARF for p53-dependent cancer protection suggests that ARF-mimicking drugs could have therapeutic activity in p53-proficient cancers. Nutlin-3a was recently discovered as a

small molecule that binds MDM2 at the pocket used for interaction with p53 (6–8). Hence, nutlin-3a prevents MDM2 from recognizing p53 and, consequently, it results in stabilization of p53 and activation of the p53 pathway. p53 is thought to acquire full transcriptional activity by the concurrence of two effects: stabilization, usually achieved by inhibition of MDM2, and posttranslational modifications produced by stress signaling cascades (1). Cancer cells, and even normal cells under *in vitro* culture conditions, are subject to intrinsic and extrinsic stresses, generally presenting high constitutive levels of DNA damage signaling; therefore, it is not surprising that stabilization of p53 by nutlin-3a suffices to trigger p53 transcriptional activity. Moreover, it is also possible that simple stabilization of p53, in the absence of stress signaling, could be sufficient to activate a p53 transcriptional response (9, 10). The rationale for using MDM2 antagonists in cancer treatment is twofold (8). First, malignant cells have constitutive stress signals, particularly DNA damage signaling (11, 12), which presumably will contribute to enhance the p53 activation upon treatment with a p53-stabilizing drug. In this regard, additional infliction of damage to tumor cells by standard genotoxic chemotherapy is known to enhance the effects of nutlin (13–17). Second, normal cells, by having intact checkpoints and low stress signaling, are thought to undergo a mild and transitory p53-dependent cell cycle arrest after treatment with nutlin, and this transient arrest, in fact, may protect normal cells from the toxicity of standard chemotherapy (18, 19). The latter approach implies that nutlin, by protecting normal tissues, could increase the therapeutic window to standard chemotherapy even in the treatment of p53-deficient tumors.

The study of the cellular responses elicited by nutlin has been restricted mainly to cell cycle arrest and apoptosis; however, the ability of nutlin to induce cellular senescence has remained unexplored. Cellular senescence is emerging as a particular type of cell cycle arrest of high relevance for tumor suppression and chemotherapy response (20–23). Indeed, there are indications that senescence may play an important role in tumor regression induced by standard genotoxic chemotherapy (24, 25). Cellular senescence is triggered by a multitude of stresses and, in general, it requires the engagement of the Rb and p53 tumor suppressor pathways (26). A main feature that distinguishes cellular senescence from other forms of cell cycle arrest is the irreversibility of this phenomenon. Full engagement of the Rb and p53 pathways results in chromatin remodeling that includes the heterochromatinization of genes important for proliferation (27–29). In this manner, cellular senescence is a terminal stage that prevents further proliferation of the cell, even if the initial causative stress is eliminated or transient. As we have discussed elsewhere (22), the fact that senescent cells are viable *in vitro* for long periods of time does not necessarily imply a long-term residence time in the context of the organism. In this regard, it has recently been shown that the induction of

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Manuel Serrano, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), 3 Melchor Fernandez Almagro Street, Madrid E-28029, Spain. Phone: 34-91-732-8032; Fax: 34-91-732-8028; E-mail: mserrano@cnio.es.

©2007 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0200

tumor senescence by p53 is followed by clearance of the senescent cells by the innate immune system, which results in tumor regression (30, 31). Here, we have taken advantage of genetically defined mouse cells, either primary or neoplastically transformed, to examine the ability of nutlin-3a to induce senescence.

Materials and Methods

Cells and reagents. Mouse embryonic fibroblasts (MEF) from E13.5 embryos of wild-type (wt), ARF-null (32), p53-null (33), or p21-null (34) genotype were obtained as previously described (35) and grown in the presence of atmospheric oxygen and in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone). In all experiments, low-passage (<3 passages) MEFs were used. Oncogenic Ras (H-Ras^{V12}) was ectopically expressed from vector pLPC-puro and cells were retrovirally transduced following standard procedures (36). Infected cells were selected with 1.5 µg/mL puromycin for 2 to 3 days as described (37). Murine fibrosarcoma cell lines were obtained from tumors induced with 3-methyl-cholanthrene as previously described (38). On observation of overt tumors, mice were sacrificed and tumors were excised and processed as follows. The tumor mass was immersed briefly in PBS with antibiotics. Small pieces of the tumor mass were minced in DMEM plus 10% FBS with scissors and allowed to attach to 60-mm-diameter dishes. Clonal cell lines were established from tumor outgrowths after four to six passages. Nutlin-3a and nutlin-3b were provided by Hoffman-La Roche, Inc..

Colony formation assays. Cells (10^4) were seeded in 10-cm-diameter plates and treatment was initiated the following day by addition of nutlin-3a or nutlin-3b (5 µmol/L). The drug was added only at the beginning of the treatment. One week later, cells were fixed in paraformaldehyde and stained with Giemsa. For reversibility studies, cells were exposed to the drug for 1 week, followed by another week in the absence of the drug.

Proliferation assays. Cells (5×10^4) were plated in 3.5-cm-diameter plates and, 24 h later, 5 or 10 µmol/L of nutlin-3a or nutlin-3b was added. For direct cell counting, attached cells were trypsinized and counted using a Neubauer chamber slide. Reversibility was evaluated by exposing the cells to the drug for variable periods of time, as indicated, followed by a recovery period of 3 days in the absence of the drug. For S-phase and sub-G₀-G₁ quantification, both floating and attached cells were fixed in 70% ethanol, resuspended in PBS, and treated with RNase A. Propidium iodide was added to the cells and cell cycle profiles were analyzed by flow cytometry in a FACScalibur instrument (BD Biosciences) and using the ModFit software (Verity Software House).

Senescence-associated β -galactosidase staining. Cells (5×10^4) were plated in 3.5-cm-diameter plates and treated for 1 week with nutlin-3a or nutlin-3b (10 µmol/L). For senescence-activated β -galactosidase (SA- β Gal) staining, we used Senescence- β Gal Staining Kit (Cell Signaling Technology) following the manufacturer's instructions.

Immunoblots. Whole-cell protein extracts were obtained using RIPA buffer. For immunoblotting, we used the following primary antibodies: anti-p53 (NCL-p53-CM-5p, Novocastra), anti-phospho-Ser¹⁸ p53 (Cell Signaling Technology), anti-p21 (p21-C-19-G, Santa Cruz Biotechnology), anti-MDM2 (2A10, Abcam), and anti- β -actin (clone AC-15, Sigma). Protein levels were visualized after incubation with the appropriate secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase followed by detection with enhanced chemiluminescence plus (Amersham).

Results

Nutlin-3a induces p53-dependent cell cycle arrest in primary MEFs. Normal primary MEFs have a limited proliferation potential under standard culture conditions (i.e., 20% oxygen and 10% serum) due to the accumulation of oxidative and mitogenic stress (39, 40). The main molecular barrier activated by "in vitro culture" stress in murine fibroblasts is the ARF/p53 pathway and, accordingly, ARF-null or p53-null MEFs have an indefinite proliferative potential in culture (32, 41). Culture stress can be

evaluated by plating cells at low density and scoring their ability to form colonies. We began our studies on nutlin by evaluating its effect on colony formation. In the presence of nutlin-3a, primary ARF-null MEFs lost their capacity to form colonies whereas p53-null MEFs were completely insensitive (Fig. 1A). Wild-type MEFs, as expected, could not form colonies either in the absence or presence of nutlin-3a. To better define the antiproliferative effect of nutlin-3a, we carried out short-term proliferation assays. Cell proliferation was measured directly by cell counting (Fig. 1B) and by cytometry to measure the proportion of cells in S phase (Fig. 1C). Nutlin-3a was a potent proliferation inhibitor for wt and ARF-null MEFs, whereas it had no effect on the proliferation of p53-null MEFs. As a control, the enantiomer nutlin-3b, which has 150-fold less activity compared with nutlin-3a (7), did not affect the proliferation of MEFs (Fig. 1B and C). Noteworthy, cell numbers for wt and ARF-null MEFs remained essentially constant in the presence of nutlin-3a, suggesting that the drug has a cytostatic effect on these cells (see Fig. 1B). In this regard, cytometric analyses did not show evidence of apoptosis in any of the genotypes on prolonged exposure to nutlin-3a (data not shown). The activation of p53 by nutlin-3a was confirmed by immunoblot analysis that showed stabilization of p53, increased p53 phosphorylation at Ser¹⁸, and increased levels of the p53 downstream targets MDM2 and p21 (Fig. 1D). It is known that p21 is an important, although not essential, mediator of p53-dependent cell cycle arrest (42). In line with this, we observed that p21-null MEFs arrest efficiently on treatment with nutlin (Supplementary Fig. S1A), although the irreversibility of the arrest has slower kinetics compared with wt MEFs (see below). Together, these results indicate that nutlin-3a inhibits the proliferation of primary MEFs in a p53-dependent manner.

Nutlin-3a induces p53-dependent arrest in MEFs expressing oncogenic Ras. Primary ARF-null MEFs and p53-null MEFs are permissive to Ras-driven proliferation, whereas wt MEFs undergo a permanent proliferative arrest, termed oncogene-induced senescence, which is dependent on the activation of the ARF/p53 pathway (43). We wondered whether the presence of oncogenic signaling would affect the response of cells to nutlin. Primary MEFs of different genotypes were retrovirally transduced with H-Ras^{V12} and the resulting cells were tested for their sensitivity to nutlin. The ability of ARF-null/Ras MEFs to form macroscopic colonies was completely abrogated in the presence of Nutlin-3a, whereas p53-null/Ras MEFs were not affected by the presence of the drug (Fig. 2A). As expected, wt/Ras MEFs were unable to form colonies even in the absence of nutlin due to the activation of oncogene-induced senescence. In short-term assays, the proliferation of ARF-null/Ras MEFs was completely blocked by nutlin-3a, whereas p53-null/Ras MEFs proliferated in the presence of the drug (Fig. 2B). On the other hand, Ras-infected wt or p21-null MEFs had a severely impaired proliferation due to oncogenic stress, and the residual proliferation disappeared in the presence of nutlin-3a (see Fig. 2B and Supplementary Fig. S1B). As it was the case with primary MEFs, the drug seemed to have a cytostatic effect and no evidence of apoptosis was observed in any of the Ras-expressing cells regardless of the functionality of the ARF/p53/p21 pathway (data not shown). As shown in Fig. 2C, the stabilization and activation of p53 was confirmed by immunoblot analysis in MEFs after selection of retrovirally infected cells (i.e., before the onset of oncogene-induced senescence in wt/Ras MEFs). A strong accumulation of p53 and phospho-Ser¹⁸ p53 was evident in wt/Ras and ARF-null/Ras cells treated with nutlin-3a, together

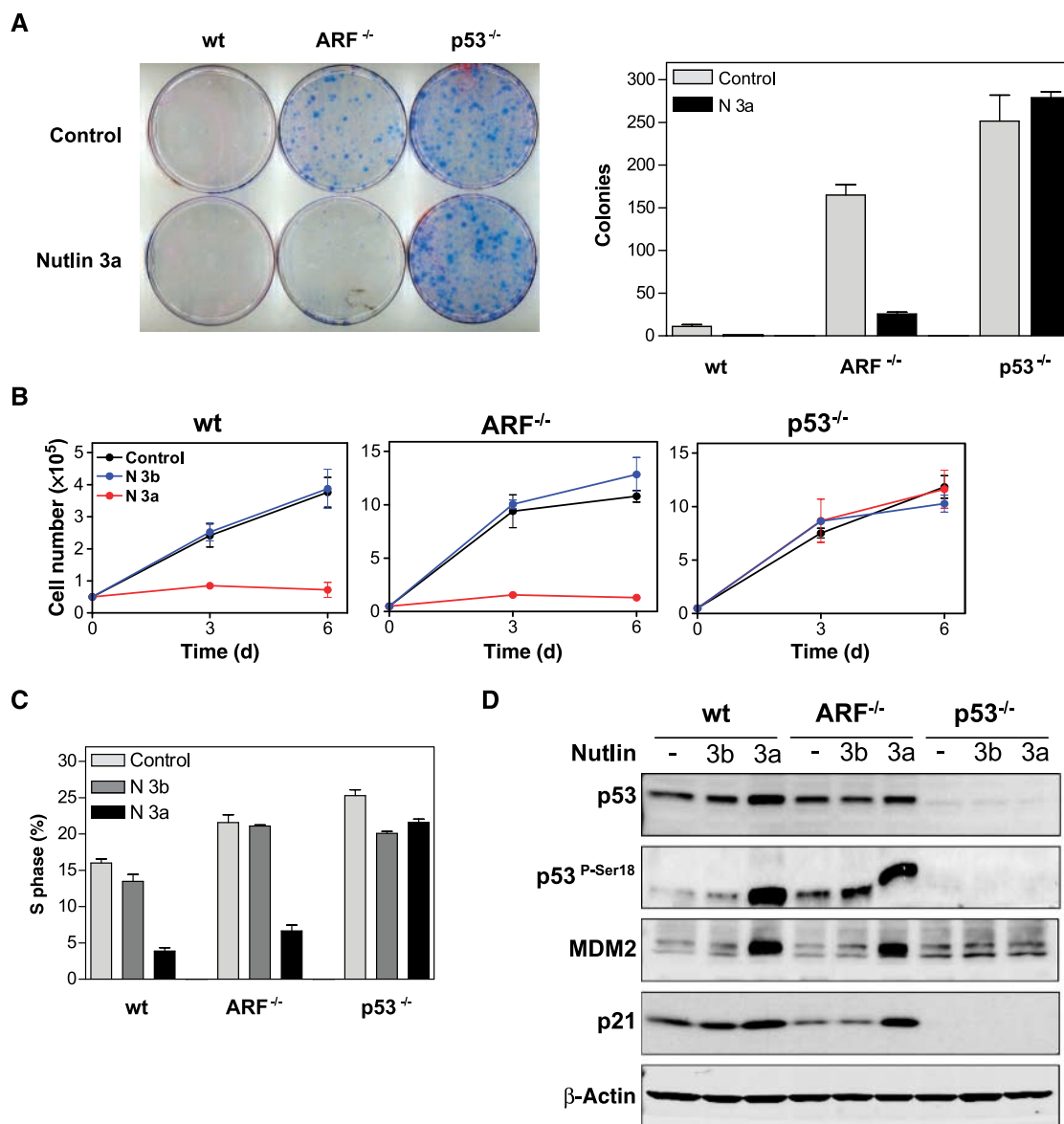


Figure 1. Nutlin-3a induces p53-dependent cell cycle arrest in primary MEFs. *A*, cells of the indicated genotypes were seeded and allowed to form macroscopic colonies during 1 wk in the absence or presence of nutlin-3a (5 μ mol/L); after this time, plates were fixed and stained (*left*). The number of colonies was scored in three independently derived MEFs for each genotype (*right*). Columns, average; bars, SE. *B*, MEFs of the indicated genotypes were treated with nutlin-3a or nutlin-3b (5 μ mol/L) and the number of cells was counted at the indicated days. Points, average of three independent MEF preparations for each genotype; bars, SE. Representative of a total of three assays. *C*, cells treated for 2 d with nutlin-3a or nutlin-3b (10 μ mol/L) were used to quantify the proportion of cells in S phase by cytometry using propidium iodide. *D*, immunoblot analysis of cells treated for 8 h with nutlin-3a or nutlin-3b (5 μ mol/L).

with increased levels of p21 and MDM2. In summary, we conclude that nutlin-3a blocks Ras-driven proliferation of MEFs in a p53-dependent manner.

Nutlin-3a induces p53-dependent senescence. The activation of the p53 pathway, either by strong DNA damage or by oncogenic stress, is known to result in an irreversible cell cycle arrest termed senescence (44, 45). We asked whether the cell cycle arrest produced by nutlin in primary MEFs and Ras-infected MEFs had features of senescence. First, nutlin-3a induced a p53-dependent morphologic change in primary MEFs (not shown) and in Ras-infected cells (Fig. 3*A*, *left*), which is compatible with senescence

(i.e., large and flat cells). Moreover, both primary and Ras-infected ARF-null MEFs treated with nutlin-3a became positive for the widely used senescence marker SA- β Gal (Fig. 3*A*, *right*; ref. 46). As a first approach to evaluate the irreversibility of the arrest induced by nutlin, we carried out colony formation assays in which cells were exposed to the drug for 1 week and then were incubated for an additional week in the absence of the drug. Both primary and Ras-infected ARF-null MEFs were unable to form colonies under these conditions (Fig. 3*B*), suggesting that the arrest induced by nutlin is irreversible after 1 week of exposure to the drug. To estimate the minimal exposure time required to trigger an irreversible cell cycle

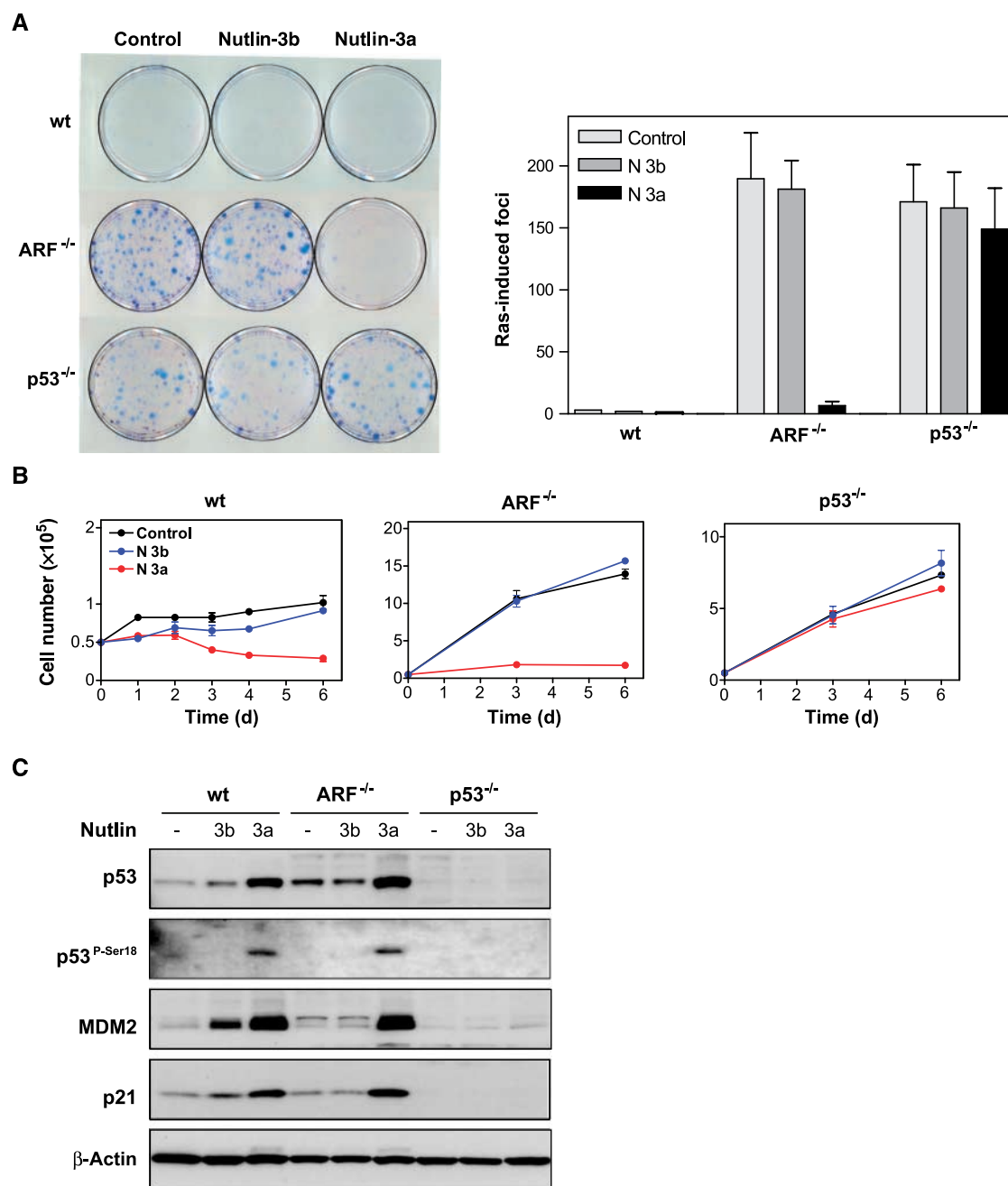


Figure 2. Nutlin-3a induces p53-dependent cell cycle arrest in Ras-infected MEFs. **A**, Ras-infected MEFs of the indicated genotypes were seeded and allowed to form macroscopic colonies during 1 wk in the absence or presence of nutlin-3a or nutlin-3b (5 μ mol/L); after this time, plates were fixed and stained (*left*). The number of colonies was scored in three independently derived MEFs for each genotype (*right*). *Columns*, average; *bars*, SE. **B**, Ras-infected MEFs of the indicated genotypes were treated with nutlin-3a or nutlin-3b (5 μ mol/L) and the number of cells was counted at the indicated times. *Points*, average of two or three independent MEF preparations for each genotype; *bars*, SE. Representative of a total of three assays. **C**, Ras-infected MEFs were treated for 24 h with nutlin-3a or nutlin-3b (10 μ mol/L) and the status of the p53 pathway was analyzed by immunoblot. Treatment with the drug was begun 1 d after selection of Ras-infected MEFs (for 2–3 d with puromycin).

arrest, cells were treated for various time periods and then observed for their ability to resume proliferation. In the case of primary wt MEFs, 1 day of treatment was sufficient to produce an irreversible arrest (Fig. 3C). ARF-null MEFs also underwent an irreversible arrest but this required longer exposure time (4 days; see Fig. 3C). As anticipated, p53-null MEFs were insensitive to the drug. Finally, in the case of p21-null MEFs, complete irrevers-

ibility was not achieved even after 4 days (Supplementary Fig. S1C), which we interpret as evidence of the involvement of p21 in the establishment of p53-dependent senescence. The same type of analysis was done with Ras-expressing MEFs (Fig. 3D). Again, p53-null/Ras MEFs were insensitive to nutlin, whereas ARF-null/Ras MEFs turned out to be extremely sensitive. It is interesting to note the difference between primary ARF-null and ARF-null/Ras MEFs

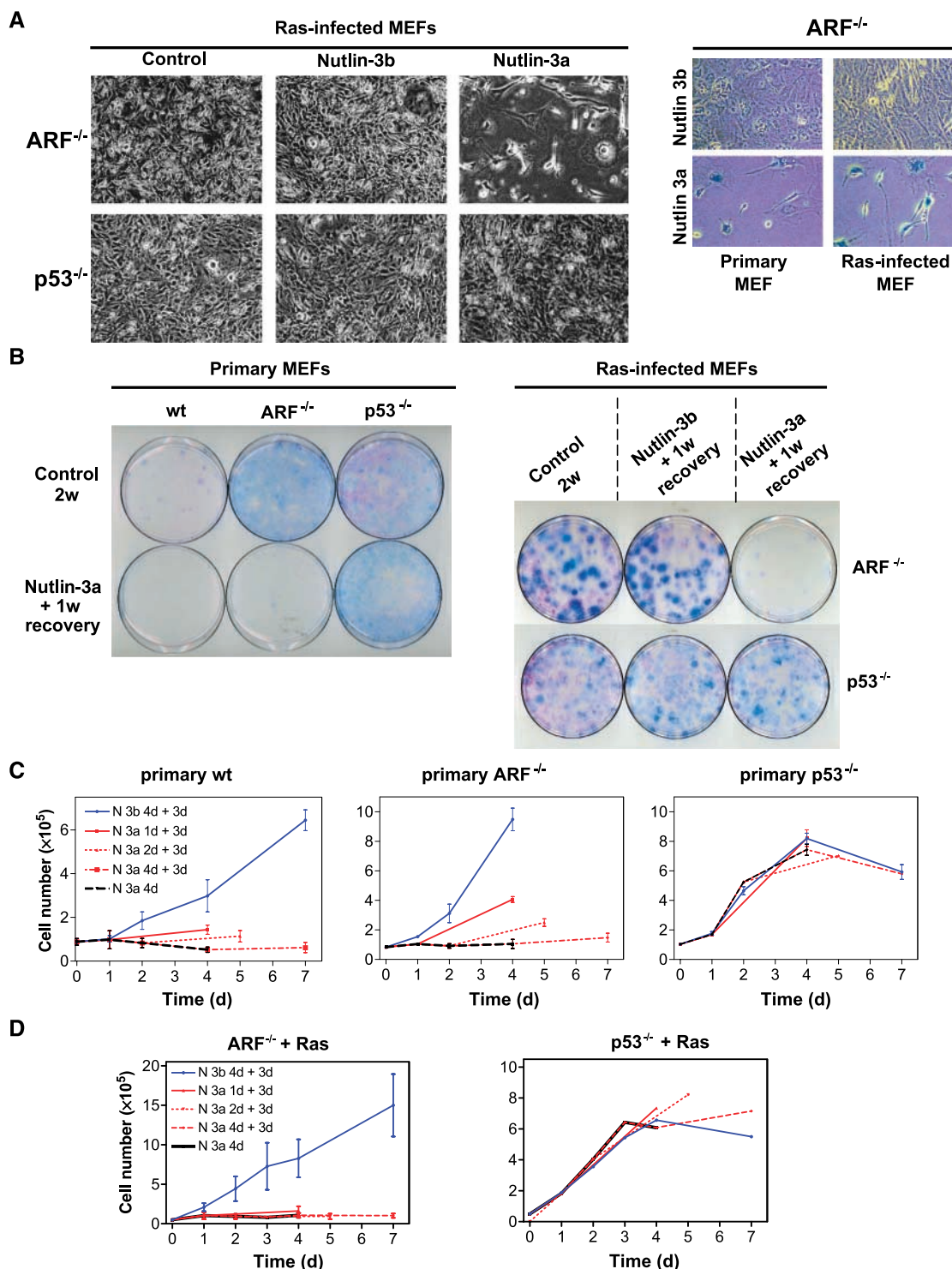


Figure 3. Nutlin-3a induces p53-dependent senescence. *A, left*, representative photomicrographs of Ras-infected MEFs of the indicated genotypes after 3 d in the presence of nutlin-3a or nutlin-3b (5 μ mol/L). Note that ARF-null/Ras and p53-null/Ras cells present a typical neoplastic morphology, which in the case of ARF-null/Ras cells is dramatically converted into a senescent morphology by nutlin-3a. *Right*, representative photomicrographs of primary ARF-null MEFs and ARF-null/Ras MEFs stained with SA- β Gal after treatment with nutlin-3a (10 μ mol/L for 1 wk). *B*, cells of the indicated genotypes, either primary or Ras-infected, were seeded and incubated for 2 wks in the absence of drug (*Control 2w*) or for 1 wk in the presence of the drug (5 μ mol/L) followed by 1 wk in its absence (*Nutlin + 1w recovery*). After incubation, plates were fixed and stained. *C*, primary MEFs were treated with nutlin (10 μ mol/L) for the indicated periods of time (1, 2, or 4 d) followed by 3 d in the absence of the drug. Cells were counted at the end of the treatment with the drug as well as at the end of the 3-d recovery period. Points, average of two or three independent MEF preparations for each genotype; bars, SE. Representative of a total of three assays. *D*, cells retrovirally transduced with Ras were seeded and incubated in the same manner as in (*C*). All the Ras-infected MEFs used in these experiments were treated with the drug the day after selection (for 3 d with puromycin). The experiment was quantified and repeated as in (*C*).

with regard to the time required to achieve irreversibility. In the case of ARF-null/Ras MEFs, the time for irreversibility was significantly shortened compared with primary ARF-null MEFs (1 day versus 4 days, respectively; see Fig. 3C and D). This differential sensitivity to nutlin likely reflects a cooperative effect between the drug and oncogenic Ras, the latter known to activate p53 by multiple pathways including the generation of DNA damage (47, 48).

Nutlin-3a induces p53-dependent senescence in murine fibrosarcoma cell lines. In the light of the previous results, we wondered whether nutlin-3a would also be able to produce p53-dependent senescence in fibrosarcoma cell lines. For this, we generated primary fibrosarcomas in wt and ARF-null mice by intramuscular injection of a well-known carcinogen, 3-methylcholanthrene. The resulting fibrosarcomas were excised and used to derive fibrosarcoma cell lines. The status of p53 was determined by DNA sequencing to identify point mutations and by Northern blot to identify those cases in which expression is completely lost (not shown); similarly, the status of ARF was determined by Northern blot to identify those fibrosarcoma cell lines that had completely lost the expression of ARF (not shown). Based on these

analyses, we selected a total of seven cell lines (see Fig. 4A). Some of these cell lines retained functional p53 but had lost the expression of ARF (p53^{wt};ARF^{silenced}, line 1); others were generated in ARF-null mice and retained functional p53 (p53^{wt};ARF^{-/-}, lines 2–4); and, finally, others lacked functional p53 (p53^{mut};ARF^{wt}, lines 5 and 7; p53^{mut};ARF^{silenced}, line 6). We evaluated the effect of nutlin-3a in these malignant cells and found that the drug selectively induced cell cycle arrest in the p53-proficient cell lines (lines 1–4) but not in the p53-deficient cell lines (lines 5–7; Fig. 4A). As another control, we also obtained fibrosarcoma cell lines from p53^{+/-} mice, which in all cases had lost p53 expression while retaining ARF (i.e., p53^{-/-};ARF^{wt}), and, as anticipated, these cell lines were completely insensitive to the drug (data not shown). Once more, apoptosis was not observed in any of the cell lines evaluated (data not shown). Activation of the p53 pathway in the p53-proficient cell lines was confirmed by immunoblot analysis (Fig. 4B). After establishing that nutlin-3a induces p53-dependent cell cycle arrest in murine fibrosarcoma cells, we wondered whether this arrest had features of senescence. On exposure to nutlin-3a, the four p53-proficient cell lines (lines 1–4) gave positive

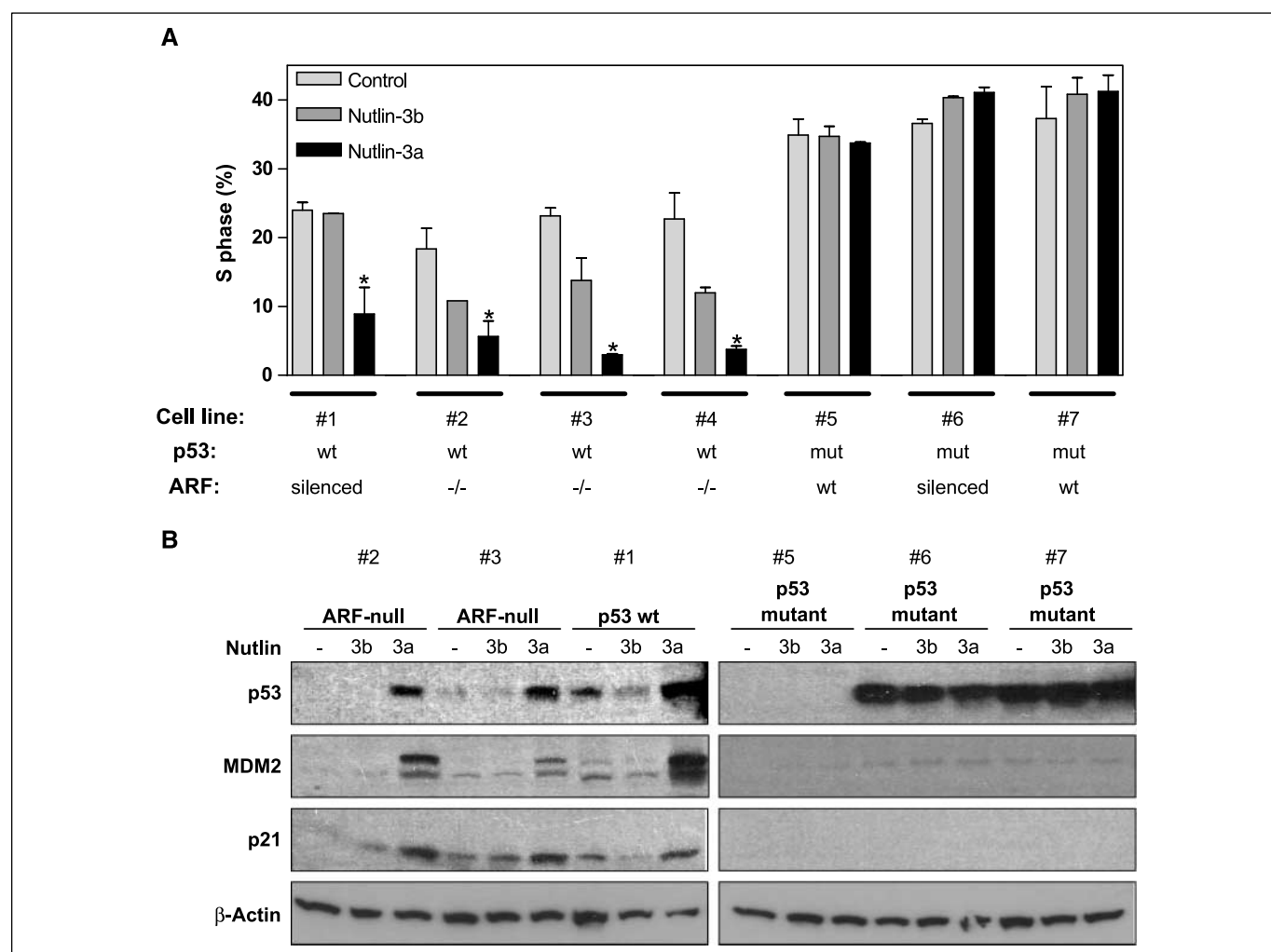


Figure 4. Nutlin-3a induces p53-dependent cell cycle arrest in murine fibrosarcoma cell lines. **A**, murine fibrosarcoma cell lines were treated with nutlin-3a or nutlin-3b (10 μ mol/L) for 48 h and the percentage of cells in S phase was quantified. Columns, average of two independent determinations; bars, SE. *, statistically significant ($P < 0.05$) of nutlin-3a-treated cells with respect to the nontreated controls (Student's *t* test). The status of p53 and ARF for each cell line is indicated at the bottom (see text and part B of this figure). **B**, fibrosarcoma cell lines were treated with nutlin-3a or nutlin-3b (10 μ mol/L) for 24 h and the levels of p53, MDM2, and p21 were determined by immunoblot of total protein extracts.

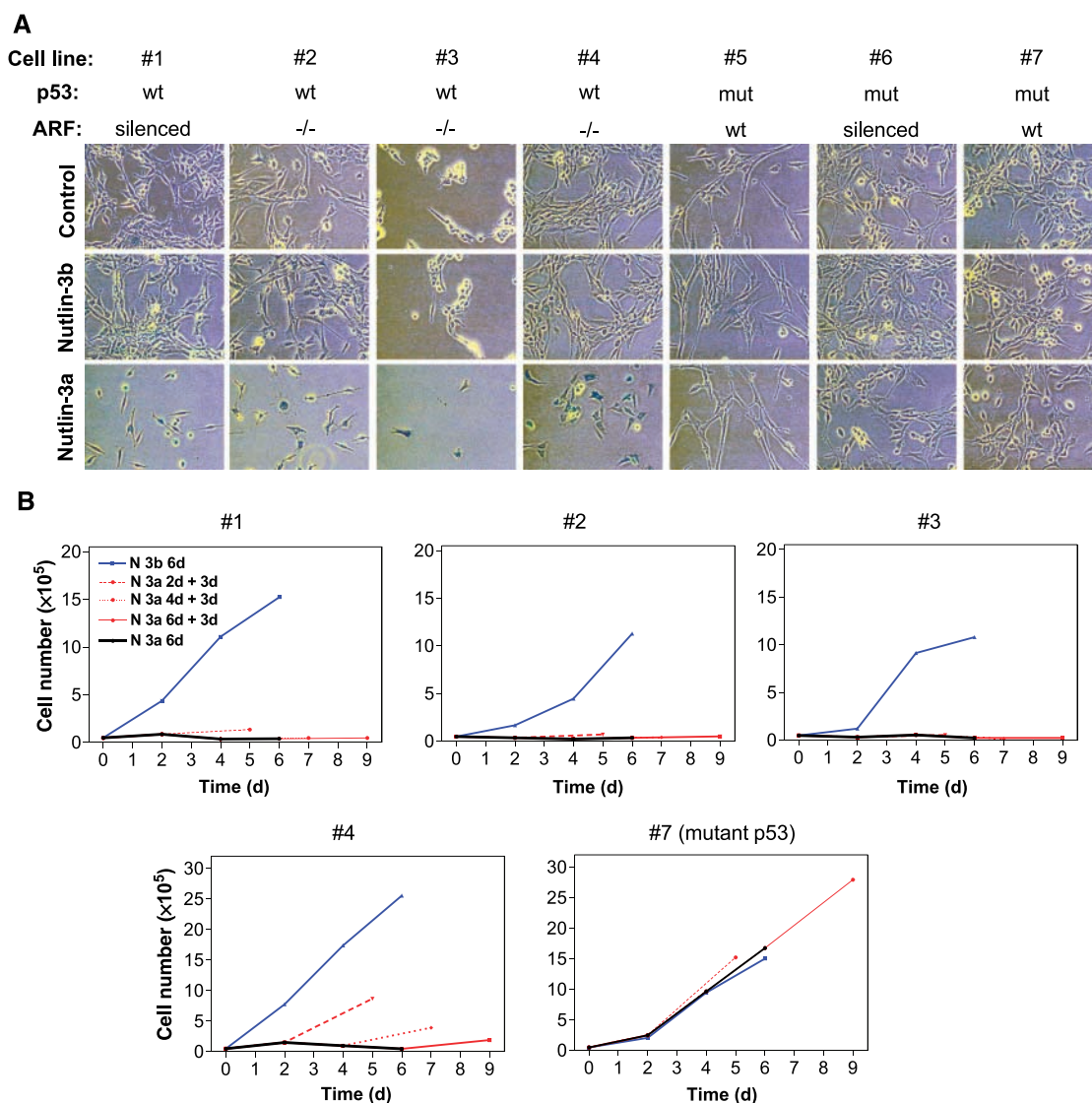


Figure 5. Nutlin-3a induces p53-dependent senescence in murine fibrosarcoma cell lines. *A*, representative photomicrographs of fibrosarcoma cells stained with SA- β Gal after treatment with nutlin-3a (10 μ mol/L for 1 wk). *B*, the indicated fibrosarcoma cell lines were treated with nutlin-3a or nutlin-3b (10 μ mol/L) for the indicated periods of time (2, 4, or 6 d) followed by 3 d in the absence of the drug. Cells were counted at the end of the treatment with the drug as well as at the end of the 3-d recovery period.

staining for SA- β Gal, whereas the others (lines 5–7) remained negative and maintained their neoplastic morphology (Fig. 5A). More importantly, we evaluated the irreversibility of the drug-induced arrest and we found that 2 days of treatment was sufficient to produce a complete and irreversible arrest in most of the p53-proficient cell lines (lines 1–3), with the only exception of line 4, which required 4 or 6 days of treatment before undergoing irreversible arrest (Fig. 5B). In summary, we conclude that, in murine fibrosarcoma cell lines, nutlin-3a induces a strong and irreversible arrest with features of senescence and in a manner that is strictly dependent on the functionality of p53.

Discussion

Here, we have examined the response to nutlin-3a in a variety of genetically defined mouse cells. Primary MEFs, oncogenically

transformed fibroblasts, and murine fibrosarcoma cell lines were all shown to undergo a robust irreversible cell cycle arrest with features of senescence on exposure to nutlin-3a. In all cases, the induction of senescence was strictly dependent on the presence of functional p53. Remarkably, as previously noted (6–8), the proliferation of cells lacking p53 was essentially unaffected even after long periods of exposure (1 week; see Figs. 1A and 2A). The fact that primary p53-null fibroblasts were insensitive to the drug further reinforces the concept that p53 is the only relevant target of nutlin. In the case of oncogenically transformed ARF-null fibroblasts, the exposure time required for irreversible cell arrest (1 day; see Fig. 3E) was significantly shorter than the time required in nontransformed primary ARF-null cells (4 days; Fig. 3D). In the case of fibrosarcoma cell lines, the exposure time required for irreversibility was more variable, but in three of four cell lines, irreversibility was achieved after 2 days of drug treatment (Fig. 5B).

We interpret this as evidence of cooperation between nutlin and oncogenic signaling in p53 activation. These results, derived from direct comparison of primary and oncogenically transformed cells of the same origin, provide a strong support to the notion that MDM2 antagonists are more effective against cancer cells than against normal cells.

It is noteworthy that no apoptosis was observed in any of the cells of fibroblast origin used in our study. It has previously been shown that normal fibroblasts are generally resistant to p53-dependent apoptosis and usually undergo cell cycle arrest and/or senescence after p53 activation. Our results indicate that this property is retained in fibrosarcoma cell lines. Amplification of the *MDM2* gene and overexpression of the protein is particularly frequent (~30%) in soft-tissue sarcomas (1). Moreover, it has been shown that among p53-wt cancer cell lines, those that overexpress MDM2 are the most sensitive to nutlin-3a treatment (49). This observation has been interpreted as evidence that the overexpression of MDM2 is the only alteration in the p53 pathway of

these cells, leaving intact other signaling cascades both upstream and downstream of p53 (49). Determination of the status of MDM2 and p53 is necessary to predict the response of tumors to nutlin-based chemotherapy. In summary, it is reasonable to speculate that tumor senescence may play an important role in the chemotherapy of soft-tissue tumors with MDM2 antagonists like nutlin-3a.

Acknowledgments

Received 1/16/2007; revised 4/12/2007; accepted 5/3/2007.

Grant support: Predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC; A. Efeyan); predoctoral fellowship from the Regional Government of Madrid (A. Ortega-Molina); the Ramon y Cajal Program of the MEC (S. Velasco-Miguel); and predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III) and the Francisco Cobos Foundation (D. Herranz). Work at the laboratory of M. Serrano is funded by CNIO, the MEC (SAF2005-03018), and the European Union (INTACT, PROTEOMAGE).

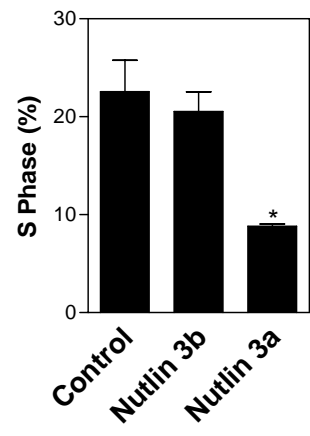
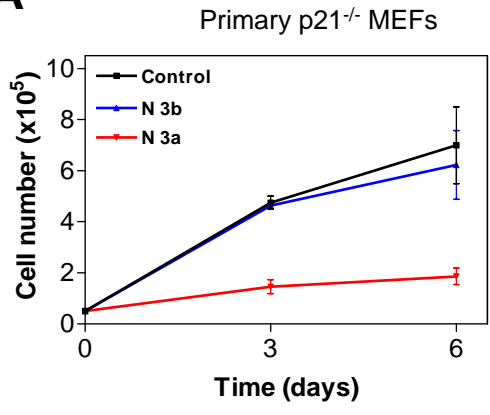
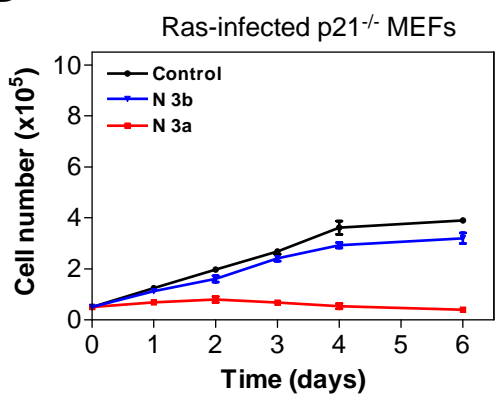
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

References

- Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: *in vitro* hypotheses, *in vivo* veritas. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:909–23.
- Vousden KH, Prives C. P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell* 2005;120:7–10.
- Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res* 2005;576:22–38.
- Christophorou MA, Ringshausen I, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* 2006;443:214–7.
- Efeyan A, Garcia-Cao I, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M. Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* 2006;443:159.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303:844–8.
- Vassilev LT. Small-molecule antagonists of p53–2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* 2004;3:419–21.
- Vassilev LT. p53 Activation by small molecules: application in oncology. *J Med Chem* 2005;48:4491–9.
- Thompson T, Tovar C, Yang H, et al. Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279: 53015–22.
- Mendrysa SM, O'Leary KA, McElwee MK, et al. Tumor suppression and normal aging in mice with constitutively high p53 activity. *Genes Dev* 2006;20:16–21.
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005;434:864–70.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005; 434:907–13.
- Barbieri E, Mehta P, Chen Z, et al. MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2358–65.
- Cao C, Shinohara ET, Subhawong TK, et al. Radio-sensitization of lung cancer by nutlin, an inhibitor of murine double minute 2. *Mol Cancer Ther* 2006;5:411–7.
- Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, Santidrian AF, et al. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2006;107:4109–14.
- Kojima K, Konopleva M, McQueen T, O'Brien S, Plunkett W, Andreff M. Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;108: 993–1000.
- Secchiero P, Barbarotto E, Tiribelli M, et al. Functional integrity of the p53-mediated apoptotic pathway induced by the nongenotoxic agent nutlin-3 in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2006;107:4122–9.
- Carvajal D, Tovar C, Yang H, Vu BT, Heimbrook DC, Vassilev LT. Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Res* 2005;65:1918–24.
- Aizu W, Belinsky GS, Flynn C, et al. Circumvention and reactivation of the p53 oncogene checkpoint in mouse colon tumors. *Biochem Pharmacol* 2006;72:981–91.
- Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 2003;63:2705–15.
- Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res* 2006;66:2881–4.
- Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:472–6.
- Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence—halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1037–46.
- te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2002;62:1876–83.
- Roberson RS, Kussick SJ, Vallieres E, Chen SY, Wu DY. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* 2005;65:2795–803.
- Dimiri GP. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell* 2005;7:505–12.
- Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003;22:4212–22.
- Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003;113:703–16.
- Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, et al. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 2005;8:19–30.
- Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumor clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007;445:656–60.
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature* 2007;445:661–5.
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997;91:649–59.
- Jacks T, Remington L, Williams BO, et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 1994; 4:1–7.
- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995;377:552–7.
- Pantoja C, Serrano M. Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 1999;18:4974–82.
- Palmero I, Serrano M. Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol* 2001;333:247–56.
- Matheu A, Pantoja C, Efeyan A, et al. Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* 2004;18:2736–46.
- Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, Martin-Caballero J, et al. “Super p53” mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 2002;21:6225–35.
- Parrinello S, Samperi E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative life span of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2003;5:741–7.
- Woo RA, Poon RY. Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev* 2004;18:1317–30.
- Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996;85:27–37.
- Wahl GM, Carr AM. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* 2001;3:E277–86.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593–602.
- Serrano M, Blasco MA. Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:748–53.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004;432:307–15.
- Dimiri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363–7.
- Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006;444: 633–7.
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicala A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006;444:638–42.
- Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, et al. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1888–93.

LEGEND TO SUPPLEMENTARY FIGURE

Figure S1. Nutlin-3a induces cell-cycle arrest in the absence of p21. **A.** (*Left panel*) Primary p21-null MEFs were treated with nutlin-3a or -3b (5 μ M) and the number of cells was counted at the indicated days. Data correspond to the average and s.e.m. of two independent MEF preparations per genotype. (*Right panel*) Primary p21-null MEFs were treated with nutlin-3a or -3b (5 μ M) for 48 h and the percentage of cells in S-phase was quantified. Values correspond to the average and s.e.m of two independent MEF preparations. Asterisks indicate statistical significant changes with respect to the non-treated controls (Student's t-test). **B.** p21-null/Ras MEFs were treated with nutlin-3a or -3b (5 μ M) and the number of cells was counted at the indicated days. Data correspond to the average and s.e.m. of two independent MEF preparations per genotype. **C.** Primary p21-null MEFs were treated with nutlin-3a or -3b (10 μ M) for the indicated periods of time (2 or 4 days) followed by 3 days in the absence of the drug. Cells were counted at the end of the treatment with the drug, as well as, at the end of the 3-day recovery period. Data correspond to the average and s.e.m. of three independent MEF preparations.

A**B****C**